SARINA **T**SUI

Estudo do cluster n-TASE nas interações ambientais de *B. seminalis* TC3.4.2R3

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

São Paulo 2021 **SARINA TSUI**

Estudo do cluster n-TASE nas interações ambientais de *B. seminalis* TC3.4.2R3

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

São Paulo 2021

SARINA TSUI

Estudo do cluster n-TASE nas interações ambientais de *B. seminalis* TC3.4.2R3

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

Versão original

São Paulo 2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Tsui, Sarina Estudo do cluster n-TASE nas interações ambientais de B. seminalis TC3.4.2R3 / Sarina Tsui; orientador Welington Luiz de Araújo. -- São Paulo, 2021. 283 p. Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Bcc. 2. HGT. 3. glicosiltransferase. 4. metiltransferase. 5. interação ambiental. I. Luiz de Araújo, Welington, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Sarina Tsui
Título da Dissertação/Tese:	Estudo do cluster n-TASE nas interações
Orientador:	Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...., considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **795/2016** referente ao projeto intitulado: *"Caracterização do gene da metiltransferase presente no cluster do antígeno-0 em Burkholderia seminalis TC3.4.2R3 e seu papel na interação com o hospedeiro"* sob a responsabilidade de *Sarina Tsui* e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) *Welington Luiz de Araújo*, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela CEPSH - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 24 de fevereiro de 2016.

1110A

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto** Coordenador CEPSH ICB/USP

À minha própria pessoa, pela infindável resiliência e por finalmente reconhecer o meu papel

Dedico

À minha família pelo apoio, carinho e pela confiança depositada em mim

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À amiga e primeira orientadora na vida científica, Profa. Dra. **Maria Carolina Quecine-Verdi** pelo admirável exemplo profissional. Meus mais sinceros agradecimentos por você ter me introduzido à paixão pela pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Welington Luiz de Araújo** (popularmente conhecido por "Wel"), por ter aberto as portas de seu laboratório quando cheguei de Piracicaba. Obrigada por ter "me adotado", sem sequer ter questionado as minhas origens e habilidades. Obrigada por acreditar que faríamos um bom trabalho juntos, mesmo sem ter tido uma amostras grátis antes.

Muita gratidão à todos do LABMEM (**Pri, Lina, Lelê, Titi, Luri, Mabel, Lili, Manu, Jennifer, Aleja, Diana, Tatá, Jojo** e **Mamá**) que eu tive o prazer de conhecer e conviver pela boa amizade, risadas, pelas longas caminhadas e filas de espera para almoçar strogonoff de frango no Bandex, pelos cafés com bolo, pelos "cúukentinhos" das gêmeas da Física, queijos do Ricardin e salamito, idas infindáveis todas as quintas-feiras (quando não tinha pandemia) para comer "camalão" no "Mulália", happy hours no "Áutibàqui" pós expediente, viagens loucas no circular da USP ... enfim, juntos desfrutamos muitos momentos ao longo destes cinco anos que me marcarão para sempre.

Especialmente, à Prizinha (hoje, Profa. Dra. **Priscila J.R.O. Gonçalves-Selari** no IF-Goiano) por ter me recebido tão bem no laboratório quando cheguei, por todas as valiosas dicas e protocolos compartilhados comigo e claro, por nossa linda amizade porta do laboratório afora. Também à Aleja (**Maria Alejandra Mantilla Galindo**) pela amizade, preocupação, valiosas dicas em experimentos, discussões sobre protocolos e principalmente por me guiar em estatística. Aprendi muito sobre como ter atitude com você, quando eu crescer quero ser uma profissional comprometida e responsável como você.

Agradeço ao queridíssimo Lelê (também conhecido por Dr. **Leandro Maza Garrido**), por ter sido o primeiro a identificar e apontar meus sintomas de frustração e tristeza com o projeto, o que me motivou a procurar por ajuda especializada. Pelas inúmeras caronas para casa com direito a show do "putusp" ao vivo e por todas as discussões enriquecedoras que tivemos sobre o projeto. Sua parcela no desenvolvimento desta cabecinha aqui é muito significativa, pode ter certeza!!!

My sincere gratitude to my BEPE's supervisor, Professor **Miguel A. Valvano**, for his patience, motivation, guidance and mentorship during the six months I have been in Belfast. His enthusiasm has inspired me greatly in the <u>Burkholderia</u> research.

I must also thank Mo (Dr. **Mohamed Hamad**), who worked beside me in the bench during short but intense two months and answered tones of my countless questions, don't mention about providing me lots of useful tips, guidance, reviews and much fun during the work. Massive thanks to my **lab colleagues from the Wellcome-Wolfson Institute for Experimental Medicine**, Julia Monjaras Feria, Fabiana Bisaro, Michael Gilmore, Amy Sterling, Georgiana Parau, Marwa Naguib, Guan Bo and Shi-Qi An, you guys made my time there very special and meaningful. Special thanks for those who became my friends in Belfast, Charlotte Olagnon, Itziar Chapartegui, Inma García and Lena Glaser, I do miss our funny and pleased time together.

À **Laura Garrido** pelos nossos encontros semanais todas as quintas-feiras, sua paciência, elucidação crítica e sincera das minhas preocupações me permitiram chegar até o dia de hoje. Tenho absoluta certeza que a sua participação em minha vida fez uma diferença tremendamente essencial. Obrigada por acender uma lanterna para mim, onde tudo já estava em seu completo breu.

Aos **meus pais**, Tsui e Yan por me permitirem pensar na hipótese de desistir do doutorado quando eu não tinha mais forças e motivação para seguir em frente. Às **minhas irmãs**, Tai e Carol, sem vocês, nada seria possível. A compreensão e apoio de vocês foi o combustível que eu precisei para dar continuidade.

Ao imensuravelmente amado **Chuchu** (So Pei Yeu), por sua parceria, amor, confiaça e principalmente por me proporcionar o ambiente familiar que tenho hoje ao seu lado. Se eu pudesse voltar atrás, eu escolheria novamente ter vindo para São Paulo para realizar o meu doutorado ao seu lado. Obrigada por ser quem você é!

Agradecimento adicional e redigido nos últimos instantes pré-depósito ao meu amado filhote que ainda aguarda o nascimento em meu ventre, **Oliver So**. Obrigada por me manter sã durante os meses de escrita de tese que coincidiram com os dois primeiros trimestres de gestação. Obrigada por ter sido tão bonzinho, paciente, saudável e colaborador comigo. Obrigada por me proporcionar uma gestação tão suave e ser meu combustível, fazendo com que essa escrita se tornasse mais gostosa e leve.

Aos **funcionários** do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-II) pela disposição em dar suporte, amizade, convivência e cumplicidade. Especialmente à Gisele Santana por estar sempre segurando a barra dos aluninhos da pós, e por resolver todos nossos problemas burocráticos, independentemente da profundidade do buraco.

Aos **professores** do programa de pós-graduação em Microbiologia que contribuíram para o meu aprendizado.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Micro-organismos "Prof. João Lúcio de Azevedo" da ESALQ/USP, pela amizade e ensinamentos durante as minhas visitas esporádicas ao laboratório para realização de experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - **FAPESP** (processos **2016/17173-3** e **2018/04397-6**) e à **CAPES** (processo **1614276**) pelo apoio financeiro.

"Let's all remember the importance of studying interesting problems, regardless of their potential for biotechnology"

Luciano A. Marrafini

RESUMO

TSUI, S. **Estudo do cluster n-TASE nas interações ambientais de** *B. seminalis* **TC3.4.2R3**. 2021. 283f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Espécies do gênero Burkholderia são fortemente associadas ao seu comportamento patogênico, devido ao agravamento do guadro de pacientes com o sistema imunológico comprometido. Apesar disso, existe um grande interesse nas bactérias desse gênero visando aplicações biotecnológicas, principalmente na área agrícola. Existem estudos que demonstram a importância de Burkholderia spp. na promoção de crescimento vegetal, biorremediação, controle biológico etc. A espécie Burkholderia seminalis tem sido isolada de diversos tipos de amostras como água, solo, rizosfera, sementes, plantas a clínicas, onde pode estar envolvida em infecções nosocomiais. Também é considerada fitopatogênica para damasco, em diversos modelos animais foi observado que essa espécie possui fraca virulência e, não apresenta capacidade de colonizar/infectar pulmões de ratos. A linhagem TC3.4.2R3 de B. seminalis, isolada das raízes de cana-de-acúcar, apresenta atividade antagônica frente a uma série de fungos fitopatogênicos. Além disso, apresenta uma atividade potencial para o controle de sintomas de necrose foliar em orquídeas causada pela espécie Burkholderia gladioli. Algumas características relacionadas à promoção de crescimento foram observadas nessa linhagem. A linhagem TC3.4.2R3 possui uma região que compreende às locus tags Bsem_02857 a Bsem_02860 (cluster n-TASE), ausente nos demais genomas de Burkholderia utilizados como referência para sua anotação (B. cenocepacia J2315 e B. ambifaria AMMD). Acredita-se que esse cluster tenha sido adquirido por transferência horizontal e mantido no genoma desta bactéria por pressão de seleção. Assim, o principal objetivo do presente estudo foi entender a origem evolutiva desse cluster gênico, bem como o seu papel nos mecanismos de interação em TC3.4.2R3. Avaliou-se a história evolutiva do cluster n-TASE em TC3.4.2R3, por meio da combinação de métodos de estudo de HGT como filogenia, genômica comparativa e análise molecular. Posteriormente, foi realizada a caracterização do cluster n-TASE, por meio da obtenção de dois mutantes via mutagênese insercional com o plasmídeo pGPΩTp, SST57 com mutação no gene Bsem_02857 e SST28 com mutação no gene Bsem 02858. O cluster n-TASE de TC3.4.2R3 apresentou maior similaridade com as sequências homólogas de Aquamicrobium sp. SK-2 e B. contaminans LMG23361. Foi possível fornecer evidências de que o n-TASE foi adquirido por meio de um evento de HGT Observou-se uma correlação de natureza ainda desconhecida dos genes do n-TASE cluster com motilidade do tipo swarming, produção de biofilme, tolerância ao estresse oxidativo e sobrevivência bacteriana em hemolinfa de G. mellonella, mas não correlacionada à virulência bacteriana a este tipo de modelo de infecção. Futuramente, serão necessários experimentos para o melhor entendimento da forma como esses genes atuam nesses processos.

Palavras-chave: Bcc; HGT; glicosiltransferase; metiltransferase; interação ambiental; cluster gênico

ABSTRACT

TSUI, S. **Study of the n-TASE cluster on environmental interactions of** *B. seminalis* **TC3.4.2R3.** 2021, 283f. PhD thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Species of the Burkholderia genus are strongly associated with its pathogenic behavior, due to the worsening of patients with compromised immune systems. Despite this, there is a great interest in bacteria of this genus aiming at biotechnological applications, mainly in the agricultural area. There are studies that demonstrate the importance of *Burkholderia* spp. in the promotion of plant growth, bioremediation, biological control etc. The Burkholderia seminalis species has been isolated from different types of samples such as water, soil, rhizosphere, seeds, plants and clinics, where it may be involved in nosocomial infections. It is also considered phytopathogenic for apricots, in several animal models it was observed that this species has weak virulence and does not show the ability to colonize/infect rat lungs. The TC3.4.2R3 strain of *B. seminalis*, isolated from sugarcane roots, presents antagonistic activity against a series of phytopathogenic fungi. Furthermore, it has a potential activity to control symptoms of leaf necrosis in orchids caused by Burkholderia gladioli species. Some characteristics related to growth promotion were observed in this strain. The TC3.4.2R3 lineage has a region comprising the locus tags Bsem_02857 to Bsem_02860 (cluster n-TASE), absent in the other Burkholderia genomes used as reference for its annotation (B. cenocepacia J2315 and *B. ambifaria* AMMD). It is believed that this cluster was acquired by horizontal transfer and maintained in the genome of this bacterium by selection pressure. Thus, the main objective of this study was to understand the evolutionary origin of this gene cluster, as well as its role in the interaction mechanisms in TC3.4.2R3. The evolutionary history of the n-TASE cluster in TC3.4.2R3 was evaluated by combining HGT study methods such as phylogeny, comparative genomics and molecular analysis. Subsequently, the characterization of the n-TASE cluster was performed, by obtaining two mutants via insertional mutagenesis with the plasmid pGPΩTp, SST57 with mutation in the Bsem_02857 gene and SST28 with mutation in the Bsem 02858 gene. The n-TASE cluster of TC3.4.2R3 showed greater similarity with the homologous sequences of Aquamicrobium sp. SK-2 and B. contaminans LMG23361. It was possible to provide evidence that n-TASE was acquired through an HGT event. A correlation of a still unknown nature of the n-TASE cluster genes with swarming motility, biofilm production, tolerance to oxidative stress and bacterial survival in G. mellonella hemolymph, but not correlated to bacterial virulence in this type of infection model. In the future, experiments will be needed to better understand how these genes act in these processes.

Keywords: Bcc; HGT; glycosyltransferase; methyltransferase; environmental interaction; gene cluster

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Revisão bibliográfica	21
<u>1.1.1 O Gênero Burkholderia</u>	21
<u>1.1.2 O complexo Bcc (Burkholderia cepacia complex)</u>	26
<u>1.1.3 Interações envolvendo Burkholderia</u>	32
1.1.4 Importância biotecnológica de Burkholderia	39
1.1.4.1 <i>Burkholderia</i> como agente de controle biológico	41
<u>1.1.5 A espécie B. seminalis</u>	46
1.1.5.1 A linhagem <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	49
1.1.5.2 O cluster n-TASE em TC3.4.2R3	52
<u>1.1.6 Transferência horizontal gênica do cluster n-TASE</u>	54
1.1.7 Estratégias de mutagênese para o estudo de genes	56
<u>1.1.8 Utilização de modelo Galleria melonella</u>	60
REFERÊNCIAS	68
2 INFERÊNCIA DE TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DO CLUSTER <i>N-TAS</i>	E
DECUMO	92
	92
	93
2.1 Introdução	94
2.2 Materiais e métodos	96
2.2.1 Linhagens bacterianas	96
2.2.2 Análise integrada de ilhas genômicas	96
2.2.3 Detecção por PCR do cluster n-TASE em Burkholderia spp	97
2.2.4 Análise filogenética	97
2.2.5 Conteúdo de GC e viés de códon	99
<u>2.2.6 Busca de similaridade entre o n-TASE e os genes flanqueadores em</u> <u>Burkholderia spp.</u>	99
2.3 Resultados	100
2.3.1 Análise integrada de ilhas genômicas	100

SUMÁRIO

2.3.2 Análise comparativa da estrutura genética e detecção por PCR d	o cluster n-
<u>TASE</u>	
2.3.3 Busca de similaridade de sequência e composição do genoma	404
2.3.4 Análise filogenética	
2.4 Discussão	124
2.5 Conclusões	
REFERÊNCIAS	
3 MUTAGÊNESE E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DO CLUSTER N	
RESUMO	
ABSTRACT	
3.1 Introdução	
3.2 Materiais e Métodos	
3.2.1 Linhagens bacterianas e condições utilizadas	
3.2.2 Geração de células competentes	
<u>3.2.2.1 Escherichia coli</u>	
3.2.2.2 <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	
3.2.3 Métodos de recombinação de DNA	
3.2.4 Procedimentos para inserção de DNA em bacteria	
3.2.5 Teste de resistência a antibióticos	
<u>3.2.6 Métodos de obtenção de mutantes de B. seminalis TC3.4.2R3</u>	
3.2.6.1 <i>Splicing by overlapping extension</i> (SOEing) PCR	
3.2.6.1.1 Desenho de primers	151
3.2.6.1.2 PCR para geração de fragmentos e cassete de mutação	155
3.2.6.2 In-Fusion Cloning	
3.2.6.3 CRISPR/Cas9	
3.2.6.3.1 Vetor all-in-one pSF	
3.2.6.3.1.1 Avaliação de células eletrocompetentes	
3.2.6.3.2 Sistema de CRISPR/Cas9 com dois vetores	
3.2.6.3.2.1 Construção do cassete de DNA doador	
3.2.6.3.2.2 Construção do plasmídeo pTarget_MTF	
3.2.6.3.2.3 Transformação de TC3.4.2R3 com pCas	

3.2.9.5 Produção de biofilme em duas temperaturas	191
3.2.9.4 Motilidade bacteriana em duas temperaturas	190
3.2.9.3 Crescimento bacteriano de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 e seus mutant	t es 189
3.2.9.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	188
3.2.9.1.5 Atividade antimicrobiana de <u>B. seminalis</u> contra leveduras e bactéria patogênicas	s 186
3.2.9.1.4 Antagonismo fúngico por compostos voláteis e difusíveis	185
3.2.9.1.3 Atividade antagônica contra <u>Fusarium</u> spp. em duas temperaturas	185
3.2.9.1.2 Atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos	182
3.2.9.1.1 Atividade antimicrobiana do mutante de transposon M30	182
3.2.9.1 Atividade antagônica	181
<u>3.2.9 Caracterização fenotípica de mutantes SST57 e SST58</u>	181
3.2.8.4 Reação de RT-PCR	181
3.2.8.3 Síntese de cDNA	180
3.2.8.2 Extração de RNA	179
3.2.8.1 Desenho de oligonucleotídeos para RT-PCR	178
<u> </u>	178
3.2.8 RT-PCR para confirmação de mutantes SST57 e SST58	.,0
3.2.7 Complementação gênica dos mutantes SST57 e SST58	178
3 2 6 5 2 Tasta da astabilidada	175
32651 Obtenção de mutantes	175
3 2 6 5 Mutagânese por inserção de nGPOTo	174
32612 Compatibilidade de votoros om TC212P2	173
3.2.0.4 Sistema de deleção I-Scel	10/
2 0 6 4 Ciatama da dala año I Casl	100
3.2.6.3.2.4 Nocaute de Bsem_02858 utilizando o sistema de dois plasmídeos	

3.2.9.6 Detecção de produção de AHL	. 191
3.2.9.6 Avaliação de tolerância a estresses ambientais	
	. 192
3.2.9.6.1 Estresse oxidativo induzido por H_2O_2	. 193
3.2.9.7 Produção de toxoflavinas	. 194
3.2.9.8 Interação com <i>B. gladioli</i> ORQF-04F, causadora de necrose folia <i>Oncidium</i> Aloha Iwanaga	r em . 194
3.2.9.8.1 Avaliação da atividade antagônica de B. seminalis contra B. gladioli ORQF-04F por meio de metodologia cross-streak	194
3.2.9.8.2 Avaliação da atividade antagônica de B. seminalis contra B. gladioli ORQF-04F por meio de metodologia spot-on-the-lawn	
	. 195
3.2.9.8.3 Avaliação da atividade antagônica de B. seminalis contra B. gladioli ORQF-04F por meio do controle necrose foliar de orquídea	40/
	. 196
3.2.9.9 Extração de LPS e analise por eletroforese em gel de SDS- poliacrilamida	. 196
3.2.9.10 Infecção em <i>Galleria mellonella</i>	. 197
3.2.9.10.1 Determinação de carga bacteriana	. 197
3.2.9.10.2 Infecção com B. seminalis TC3.4.2R3 e mutantes	199
3.2.9.10.3 Experimento piloto para extração de hemolinfa	. 200
3.2.9.10.4 Sobrevivência bacteriana em hemolinfa	. 202
3.2.9.10.5 Detecção bacteriana por PCR	. 202
3.2.11 Análise estatística	. 203
3.3 Resultados	. 203
3.3.1 Teste de resistência a antibióticos	. 203
<u>3.3.2. Métodos de obtenção de mutantes de B. seminalis TC3.4.2R3</u>	
	. 205
3.3.2.1 Splicing by overlapping extension (SOEing) PCR	. 205
3.3.2.2 In-Fusion Cloning	. 207
3.3.6.3 CRISPR/Cas9	. 208
3.3.6.3.1 Vetor all-in-one pSF	. 208
3.3.6.3.1.1 Avaliação de células eletrocompetentes	. 210
3.3.6.3.2 Sistema de CRISPR/Cas9 com dois vetores	. 210

3.3.6.4 Sistema de deleção I-Scel	214
3.3.6.4.1 Essencialidade de Bsem_02858	221
3.3.6.4.2 Compatibilidade de vetores em TC3.4.2R3	222
3.3.6.5 Mutagênese por inserção de pGPΩTp	222
3.3.6.5.1 Teste de estabilidade	224
<u>3.3.7 Complementação gênica dos mutantes SST57 e SST58</u>	224
3.3.8 RT-PCR para confirmação de mutantes SST57 e SST58	
	224
3.3.8.1 Validação de oligonucleotídeos para RT-PCR	221
3.3.8.2 Extração de RNA	224
3.3.8.3 Reação de RT-PCR	226
<u>3.3.9 Caracterização fenotípica de mutantes SST57 e SST58</u>	229
3.3.9.1 Atividade antagônica	
-	229
3.3.9.1.1 Atividade antimicrobiana do mutante de transposon M30	229
3.3.9.1.2 Atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos	229
3.3.9.1.3 Atividade antagônica contra <u>Fusarium</u> spp. em duas temperaturas	231
3.3.9.1.4 Antagonismo fúngico por compostos voláteis e difusíveis	235
3.3.9.1.5 Atividade antimicrobiana de <u>B. seminalis</u> contra leveduras e bactéria patogênicas	s 236
3.3.9.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	237
3.3.9.3 Crescimento bacteriano de <i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3 e seus mutant	t es 240
3.3.9.4 Motilidade bacteriana em duas temperaturas	240
3.3.9.5 Produção de biofilme em duas temperaturas	243
3.3.9.6 Detecção de produção de AHL	244
3.3.9.7 Avaliação de tolerância a estresses ambientais	245
3.3.9.7.1 Estresse oxidativo induzido por H_2O_2	245
3.3.9.8 Produção de toxoflavinas	248

3.3.9.9 Interação com <i>B. gladioli</i> ORQF-04F, causadora de necrose foliar o <i>Oncidium</i> Aloha Iwanaga	em 249
3.3.9.9.1 Avaliação da atividade antagônica de B. seminalis contra B. gladioli ORQF-04F por meio de metodologia cross-streak	249
3.3.9.9.2 Avaliação da atividade antagônica de B. seminalis contra B. gladioli ORQF-04F por meio de metodologia spot-on-the-lawn	249
3.3.9.9.3 Avaliação da atividade antagônica de B. seminalis contra B. gladioli ORQF-04F por meio do controle necrose foliar de orquídea	250
3.3.9.10 Extração de LPS e análise por eletroforese em gel de SDS- poliacrilamida	251
3.3.9.11 Infecção em <i>Galleria mellonella</i>	253
3.3.9.11.1 Determinação de carga bacteriana para experimento de infecção de mellonella	∍ G. 253
3.3.9.11.2 Infecção de G. mellonella com B. seminalis TC3.4.2R3 e mutantes	255
3.3.9.11.3 Experimento piloto para extração de hemolinfa	256
3.3.9.11.4 Sobrevivência bacteriana em hemolinfa	258
3.3.9.11.5 Detecção bacteriana por PCR	259
3.4 Discussão	261
3.5 Conclusões	272
REFERÊNCIAS	274
4 CONCLUSÕES	283

1 INTRODUÇÃO

Comumente, os estudos que abordam espécies do gênero *Burkholderia* estão associados ao seu comportamento patogênico, tendo relevante papel em infecções nosocomiais hospitalares e, principalmente, no agravamento do quadro de pacientes com o sistema imunológico comprometido e/ou aqueles acometidos pela fibrose cística. Apesar do interesse de bactérias deste gênero para estudos visando aplicações biotecnológicas ou estudos básicos, *Burkholderia* é um gênero de classificação taxonômica extremamente controversa que inclui espécies com enorme potencial biotecnológico, principalmente na área agrícola.

A preocupação em melhor entender os mecanismos envolvidos nas interações microbianas de espécies de *Burkholderia* associadas a plantas, se deve ao desconhecimento do potencial patogênico que essas bactérias podem apresentar. Uma vez que *Burkholderia* spp. podem apresentar comportamento patogênico a animais e ao mesmo tempo benéfico a plantas (EBERL; VANDAMME, 2016). Assim, as espécies que intermedeiam os grupos extremos (patogênicos exclusivos e PBE - *Plant Beneficial And Environmental* exclusivos) devem ser muito bem estudados para averiguar se existe uma troca de genes entre as espécies simbióticas e patogênicas de *Burkholderia* (ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2016). Em termos de interesse biotecnológico, a demanda por novas espécies não-nocivas à saúde humana é muito grande, visto que já foi observado que *Burkholderia* spp. podem estar envolvidas na promoção de crescimento vegetal, biorremediação, controle biológico etc. No entanto, sua utilização representa um grande risco à saúde humana e ambiental, visto que existe o potential risco de causar infecções em humanos e em animais.

A espécie *Burkholderia seminalis* tem sido isolada de diversos tipos de amostras, desde ambientais (água, solo, rizosfera, sementes, plantas) a clínicas, onde pode estar envolvida em infecções nosocomiais (VANLAERE *et al.*, 2008). Trata-se também de uma espécie considerada fitopatogênica para damasco (LI *et al.*, 2010). No entanto, em diversos modelos (incluindo *Galleria mellonella*), foi realizada a avaliação do seu potencial patogênico, e foi observado que essa espécie apresenta fraca virulência nesses modelos animais, e não apresenta capacidade de colonizar/infectar pulmões de ratos (IBRAHIM *et al.*, 2012).

A linhagem TC3.4.2R3 de *B. seminalis*, isolada das raízes de cana-de-açúcar (MENDES et al., 2007; LUVIZOTTO et al., 2010), apresenta atividade antagônica frente a uma série de fungos fitopatogênicos (NEVES, 2011; ARAÚJO; ARAÚJO; EBERLIN, 2017; ARAÚJO et al., 2017; GONÇALVES et al., 2019). Além disso, apresenta uma atividade potencial para o controle de sintomas de necrose foliar em orquídeas causada pela espécie *Burkholderia gladioli* (ARAÚJO et al., 2016). Algumas características relacionadas à promoção de crescimento foram observadas nessa linhagem, como produção de AIA e solubilização de fosfato (LUVIZOTTO et al., 2010).

No presente trabalho, tem-se como principal objetivo o esclarecimento do papel do cluster n-TASE, de 4.378 pb contendo quatro genes, na interação da linhagem TC3.4.2R3 no ambiente. O interesse nessa região que compreende às *locus tags* Bsem_02857 a Bsem_02860 surgiu durante a anotação do genoma de TC3.4.2R3, utilizando demais genomas de *Burkholderia* como referência (*B. cenocepacia* J2315 e *B. ambifaria* AMMD). Foi observado que essa região não apresenta genes homólogos correspondente nos genomas de referência. Dessa forma, acredita-se que este cluster tenha sido adquirido por transferência horizontal e mantido no genoma desta bactéria por pressão de seleção. Assim, busca-se entender a importância deste cluster e a sua origem evolutiva, bem como o seu papel nos mecansimos de interação dessa bactéria.

O gene Bsem_02858 codifica uma metiltransferase, ao ser inativado pela inserção de um mini-transposon Tn5 resultou na perda de atividade antagônica contra o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (NEVES, 2011), causador de fusariose em diversas culturas. Assim, a hipótese inicial do presente estudo foi a correlação do gene Bsem_02858 com capacidade de *B. seminalis* TC3.4.2R3 em produzir compostos antifúngicos com alvo específico em *F. oxysporum*, visto que os dois organismos compartilham o mesmo ambiente ecológico, rizosfera/raízes de plantas (como cana-de-açúcar). Assim, acredita-se que a aquisição por transferência horizontal do cluster n-TASE possa ter favorecido *B. seminalis* TC3.4.2R3 na colonização da planta hospedeira.

Dessa forma, considerando a presença desse cluster n-TASE exclusivamente na linhagem TC3.4.2R3, o presente trabalho buscou entender o seu papel nas interações ambientais dessa bactéria. Dessa forma, o primeiro capítulo traz toda a base teórica na qual se fundamenta o presente estudo; o segundo capítulo estuda por meio de abordagens *in silico* e moleculares a possível origem do cluster n-TASE em TC3.4.2R3. Por fim, o terceiro capítulo (último e mais revelador) descreve todas as metodologias de mutagênese testadas com a linhagem TC3.4.2R3 na tentativa de gerar mutantes dos quatro genes que compõem o cluster n-TASE, bem como as avaliações experimentais realizadas a fim de se obter uma melhor caracterização fenotípica dos mutantes desses genes que compõem o cluster em TC3.4.2R3.

1.1 Revisão Bibliográfica

<u>1.1.1 O Gênero Burkholderia</u>

A primeira espécie de *Burkholderia* foi descrita em 1942 por Walter H. Burkholder como *Pseudomonas caryophylli*, identificada como causadora de podridão em cebola (*Allium cepa*), sendo posteriormente denominada *Pseudomonas cepacia* (BURKHOLDER, 1950). Durante muitos anos as espécies do gênero *Burkholderia* foram incluídas no gênero *Pseudomonas* (Gamaproteobacteria) devido à extensa e indeterminada definição fenotípica. Posteriormente, Yabuuchi *et al.* (1992) propuseram o gênero *Burkholderia*, que compreendia as espécies *P. solanacearum, P. pickettii, P. cepacia, P. gladioli, P. mallei e P. caryphylli* sendo *Burkholderia cepacia* considerada a espécie tipo para este novo gênero (PALLERONI, 1997). O gênero inicialmente criado para acomodar algumas espécies de *Pseudomonas*, teve duas espécies transferidas para o gênero *Ralstonia*. Desde então, o número de espécies classificadas como *Burkholderia* tem crescido (BEUKES *et al.*, 2017).

O gênero Burkholderia (Beta-proteobacteria) é formado por bactérias Gramnegativas (YABUUCHI et al., 1992; COENYE; VANDAMME, 2003; MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG et al., 2005; COMPANT et al., 2008), móveis, aeróbicas e não formadoras de esporos (COENYE; VANDAMME, 2003; VIAL, et al, 2011). De acordo com a lista de nomes procarióticos (LPSN - *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*, 2021), o gênero abrange 144 espécies com nomes válidos, capazes de colonizar diversos ambientes, como a rizosfera de espécies vegetais, água, insetos, animais, ambientes industriais e hospitalares (COENYE; VANDAMME, 2003).

A diversidade de *Burkholderia* pode ser representada pela existência de espécies patogênicas a humanos, animais e plantas, além de uma série de linhagens com significativo potencial biotecnológico (BEUKES *et al.*, 2017), sendo as últimas chamadas de espécies PBE (*Plant Beneficial And Environmental*) (SUÁREZ-MORENO *et al.*, 2012). Mesmo assim, devido a heterogeneidade na classificação de espécies PBE, os gêneros *Caballeronia* (GYANESHWAR *et al.*, 2011) e *Paraburkholderia* (SAWANA *et al.*, 2014) foram introduzidos para acomodar a maior parte dessas espécies. Sendo que as espécies patogênicas são mantidas no gênero denominado *Burkholderia* sensu stricto (s.str.) (BEUKES *et al.*, 2017). No entanto, foi necessária a introdução do gênero *Robbsia* para acomodar a espécie fitopatogênica *Burkholderia andropogonis* (LOPES-SANTOS *et al.*, 2016). Mais recentemente, os gêneros *Mycetohabitans e Trinickia* (ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.* (2018) foram propostos para acomodar as demais linhagens que não se agruparam nos gêneros inicialmente descritos para *Burkhoderia* sensu lato (s.l.).

Estrada-de los Santos *et al.* (2016) descreveram dois grupos monofiléticos Grupos A e B em *Burkholderia*, sendo que o grupo A consiste nas espécies pertencentes aos gêneros *Caballeronia* e *Paraburkholderia*, enquanto o grupo B inclui a maioria dos patógenos (humanos, animais e fitopatógenos), também conhecidos por complexo Burkholderia cepacia (Bcc). Considera-se, portanto, a classificação de *Burkholderia* em dois táxons, sendo aquelas ambientais benéficasassociadas às plantas (i) e patogênicas (ii) (SUÁREZ-MORENO *et al.*, 2012; EBERL; VANDAMME, 2016).

No entanto, essa classificação é bastante controversa, considerando que algumas linhagens podem apresentar um comportamento patogênico a animais e ao mesmo tempo benéfico a plantas (EBERL; VANDAMME, 2016). O táxon de *Burkholderia* patogênicas envolve espécies causadoras de doenças em plantas, animais e humanos, sendo dividido em (i) grupo "pseudomallei", composto pelas espécies *B. pseudomallei, B. mallei* e *B. thailandensis* e o (ii) grupo Bcc (complexo *Burholderia cepacia*), que abrange espécies patogênicas oportunistas (SUÁREZ-MORENO *et al.*, 2012). Considerando estas diferenes estratégias de interação com

o seu hospedeiro, existe uma necessidade de entender o papel de *Burkholderia* associadas às plantas, considerando o potencial patogênico (a animais e a plantas), com o intuito de averiguar se ocorre a troca de genes entre as espécies simbióticas e patogênicas (ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2016).

A fim de de melhor entender a distribuição de *Burkholderia*, Beukes *et al.* (2017) fizeram uma análise comparativa de 106 genomas de *Burkholderia* s.l. e observaram que existem cinco grupos distintos, sendo que quatro correspondem aos gêneros *Burkholderia* s.str., *Paraburkholderia, Caballeronia* e *Robbsia.* O quarto grupo é composto pela espécie *Paraburkholderia rhizoxinica*. Além disso, os genomas de espécies que se classificam como PBE possuem algumas semelhanças com os genomas de outras *Burkholderia* s.l., como tamanho de genoma e total de genes codificados.

O gênero Caballeronia abrange espécies ambientais inicialmente agrupadas em "grupo de transição 2" (ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2016) e que posteriormente foram transferidos para o gênero Caballeronia (DOBRITSA; SAMADPOUR, 2016), além dessas, estão incluídas 13 novas espécies de Burkholderia glathei-like (OREN; GARRITY, 2016), totalizando 25 espécies das quais, nenhuma apresenta os genes *nod, nif* ou *fix*, sugerindo que não há espécies diazotróficas nesse gênero (BEUKES *et al.*, 2017).

O gênero *Paraburkholderia* apresenta uma diversidade maior de espécies, incluindo, as de vida livre e diazotróficas simbióticas, assim como espécies ambientais. Ele se separa em dois sub-clados, sendo um composto por 23 espécies (*P. caledonica* a *P. hospita*) e o outro sub-clado inclui 11 espécies (*P. kururiensis* a *P. sacchari*) (Figura 1.1). Nenhuma razão evidente para essa separação foi identificada (BEUKES *et al.*, 2017).

Figura 1.1 - Árvore filogenética (Maximum-Likelihood) de 106 genes concatenados (sequência de aminoácidos) de 92 espécies de Burkholderia avaliadas por Beuke et al. (2017). São observados três principais gêneros, Paraburkholderia, Caballeronia e Burkholderia strictu sensu (Bcc), sendo que Paraburkholderia é formado por dois sub-clados. Apenas a espécie Burkholderia andropogonis (Robbsia andropogonis) compõe o gênero Robbsia. O nome das espécies está diferentes representado em cores de acordo com o local originário de isolamento/comportamento. Observa-se que R. andropogonis embora não agrupe em Burkholderia strictu sensu é uma espécie patogênica



FONTE: adaptado de Beuke *et al*. (2017)

Embora Burkholderia s.str. seja composto por espécies patogênicas, R. andropogonis e P. rhizoxinica (que não pertencem aos gêneros Burkholderia sensu

strictu, nem Caballeronia e muito menos Paraburkholderia) correspondem a espécies patogênicas. Além disso, algumas espécies de Paraburkholderia e Caballeronia também já foram isoladas de amostras clínicas (PEETERS *et al.*, 2016). De modo geral, a taxonomia de Burkholderia s.l. permanece em fluxo, sendo ainda necessários estudos para decifrar os processos e mecanismos envolvidos na evolução dessas espécies (ESTRADA-DE LOS SANTOS *et al.*, 2016; BEUKES *et al.*, 2017) e na interação no meio ambiente.

Apesar da existência de diferenças entre os gêneros em *Burkholderia* s.l., os seus genomas geralmente têm um conteúdo de GC caracteristicamente alto (BEUKES *et al.*, 2017). Além disso, a alta frequência de ilhas genômica e sequências de inserção em *Burkholderia* spp. estão associadas a ampla diversidade funcional (CARLIER *et al.*, 2016; FLOREZ *et al.*, 2018; MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005). A estrutura do genoma composta por múltiplos replicons deve contribuir para a variabilidade genômica. Em bactérias com vários replicons, o maior cromossomo primário geralmente carrega mais genes essenciais e é conservado evolutivamente, enquanto os demais cromossomos (secundários) são mais variáveis e podem funcionar como "bancos de teste evolucionários" (evolutionary *test-bed*) (BOCHKAREVA *et al.*, 2018).

Em *B. multivorans*, os cromossomos 2 e 3 são enriquecidos com genes envolvidos em mecanismos de defesa e metabolismo secundário (PEETERS *et al.*, 2017), destacando o grande potencial para síntese de antibióticos em todo o grupo bacteriano, incluindo muitos antifúngicos, antibacterianos, herbicidas e inseticidas (DEPOORTER *et al.*, 2016, PIDOT *et al.*, 2014, VIAL *et al.*, 2007). Estima-se que, em média, 7% do genoma é dedicado a produção de metabólitos secundários em *Burkholderia* s.l., embora haja variação significativa nos diferentes subclados. Em espécies de *Paraburkholderia* e *Caballeronia*, observa-se que os clusters gênicos relacionados ao metabolismo secundário correpondem à apenas 5% de seus genomas, enquanto em *Burkholderia* s.str. esses clusters podem envolver aproximadamente 10% do genoma (DEPOORTER *et al.*, 2016).

As espécies de *Burkholderia* sensu strictu (ou bactérias do Bcc) são encontradas na rizosfera, solo e água (EBERL; VANDAMME, 2016; LOVERIDGE *et al.*, 2017). Algumas são micro-organismos de vida livre, enquanto outras apresentam associação com plantas, colonizando a superfície (epifítica) ou o interior (endofítica) dos tecidos do hospedeiro (COMPANT *et al.*, 2008).

A produção de muitos dos antibióticos, como outras características relevantes para estilos de vida associados a hospedeiros, como motilidade do tipo *swarming*, formação de biofilme e a expressão de diversos fatores de virulência dependem de *quorum sensing* (HUBER *et al.*, 2001; EBERL, 2006; NICKZAD; LEPINE; DEZIEL, 2015; SUPPIGER *et al.*, 2013). Embora o *quorum sensing* tenha sido extensamente estudado, principalmente em *Burkholderia* s.str., o mecanismo aparentemente é compartilhado entre as espécies de *Burkholderia* s.l (VIAL *et al.*, 2007; CHOUDHARY *et al.*, 2013).

Existe um enorme interesse industrial e agrícola nas espécies que compõem o Bcc, devido ao grande potential que elas apresentam na biorremediação, promoção de crescimento vegetal e na produção de metabólitos secundários (VIAL *et al.*, 2007). Apesar de representar um grande potencial biotecnológico, existem registros de espécies de Bcc responsáveis por graves infecções crônicas em pacientes imunocomprometidos, principalmente aqueles que são acometidos pela fibrose cística (CF), esse fato tem barrado estudos que visam a utilização biotecnológica de espécies de Bcc, especialmente na agricultura (VIAL *et al.*, 2011).

<u>1.1.2 O complexo Bcc (Burkholderia cepacia complex)</u>

Em meados de 1990, pesquisadores repararam que dentre as espécies identificadas como *B. cepacia,* havia uma composição de vários subgrupos distintos. Cinco genomovares foram inicialmente identificados: *B. cepacia* (genomovar I), *B. multivorans* (genomovar II), *B. cenocepacia* (genomovar III), *B. stabilis* (genomovar IV) e *B. vietnamiensis* (genomovar V) (VANDAMME et al., 1997).

Os genomovares são estreitamente relacionados e compartilham uma alta similaridade de sequências de 16S rRNA (>97,5%) e moderados valores de hibridização DNA-DNA (30-60%). Delineando um grupo com características genotípicas, fenotípicas e metabólicas muito particulares (VANDAMME; DAWYNDT, 2011). Dessa forma, *B. cepacia* não é uma espécie única, mas sim um complexo de espécies denominado de *complexo Burkholderia cepacia* (Bcc), já que

é constituído por vários micro-organismos que são fenotipicamente semelhantes, geneticamente relacionados, porém distintos (COENYE *et al.*, 2001a; 2001b).

O complexo é formado por mais de 20 betaproteobactérias Gram-negativas, não-fermentativas, amplamente distribuídas no ambiente e bastante próximas filogeneticamente (BACH *et al.*, 2017; WEBER; KING, 2017), incluindo *B. cepacia, B. multivorans, B. cenocepacia, B. vietnamiensis, B. stabilis, B. ambifaria, B. dolosa, B. anthina, B. pyrrocinia, B. ubonensis*, entre outras (LIPUMA, 2005; ONG *et al.*, 2016; BACH *et al.*, 2017). O genoma, bastante complexo, que compõe essas espécies varia de 6 a 9 Mpb comumente distribuídos em 2 cromossomos e um megaplasmídeo (pC3). Além disso, 10% de seu genoma consiste de ilhas genômicas (GIs), com DNA de origem exógena no genoma (plasmídeos, bacteriófagos e sequências de inserção), o que lhes garante rápida evolução, plasticidade e diversidade genotípica, promovendo extensa variabilidade genética e fisiológica (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2006).

Inicialmente, o interesse em estudar bactérias do Bcc surgiu devido ao risco, na forma de patógenos oportunistas relacionados complicações respiratórias, a pacientes imunocomprometidos (idosos debilitados, indivíduos HIV-positivos, pacientes com câncer em quimioterapia, etc) (EL CHAKHTOURA *et al.*, 2017), principalmente aqueles acometidos por fibrose cística (COUTINHO *et al.*, 2011) e doença granulomatosa crônica (CGD) (GREENBERG *et al.*, 2009).

Ocorrências hospitalares envolvendo espécies do Bcc são aterrorizantes devido a alta capacidade de adaptação dessas bactérias, a sua erradicação é praticamentet impossível. Culminando em resultados imprevisíveis, caracterizados pela rápida deterioração e alta variação da condição dos pacientes afetados. Consequentemente resultando no quadro menos esperado, a pneumonia necrosante fatal ou *"Syndrome Cepacia"* (MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005; SOUSA *et al.*, 2011).

Diante da notória importância das espécies do Bcc, a identificação e taxonomia dos isolados dentro do complexo são de suma importância para a sua aplicação biotecnológica. Além disso, em uma infecção envolvendo bactérias Bcc, a conduta clínica estabelecida para melhorar o quadro do paciente (como o transplante de pulmão) pode ser contra-indicada, pois pode haver um aumento da

mortalidade. Assim, o aumento do risco pode variar significativamente de espécie para espécie (MURRAY *et al.*, 2008).

Na prática a alta similaridade fenotípica e genotípica entre os membros do complexo podem levar a erros de identificação, podendo ocasionar sérios problemas na terapia de pacientes acometidos por infecções causadas pelo Bcc (JIN *et al.*, 2020). Considerando esse aspecto, a diferenciação das espécies do Bcc é necessária para terapia clínica, avaliação de prognóstico e pesquisa epidemiológica. Apesar disso, a identificação correta desses patógenos é particularmente problemática devido ao seu alto nível de similaridade, os testes fenotípicos (manuais ou automatizados) não são adequados para a identificação desses patógenos (FURLAN *et al.*, 2019; RAGUPATHI *et al.*, 2019).

Dentre as mais de 20 espécies que compõem o complexo, *B. cenocepacia* e *B. multivorans* são as mais relevantes no âmbito dos pacientes acometidos por fibrose cística (REIK; SPILKER; LIPUMA, 2005) e as outras menos representadas (*B. dolosa, B. estabilis, B. contaminans* e *B. cepacia*), porém igualmente alarmantes no quadro clínico que envolve infecções com essas bactérias (SOUSA *et al.*, 2011).

A filogenia de Bcc baseada no gene 16S rRNA não é suficiente para desenrolar a complexidade da história evolutiva do grupo, já que não apresenta suporte robusto, tornando a relação filogenética de Bcc um assunto completamente sem solução (JIN *et al.*, 2020). Em conformidade com estudos anteriores (FOX; WISOTZKEY; JURTSHUK, 1992; FURLAN *et al.*, 2019; RAGUPATHI *et al.*, 2019), o gene 16S rRNA apresenta baixa resolução taxonômica para a identificaçaão de linhagens classificadas como Bcc.

Considerando a existência de grandes conflitos taxonômicos na classificação taxonômica de espécies do Bcc, Jin *et al.* (2020) realizaram uma reorganização de espécies conhecidas de Bcc, por meio de uma análise comparativa do genoma completo de 116 linhagens de *Burkholderia*, acompanhada de uma robusta filogenia por MLSA (atpD, gltB, gyrB, recA, lepA, phaC e trpB) e em genes ortólogos de cópia única. Nessa reorganização, o complexo deve ser entendido como um agrupamento de 36 clusters genômicos (Figura 1.2), sendo que 22 deles (BCC01, BCC03, BCC04, BCC08, BCC14-16, BCC17, BCC20-25, BCC28, BCC29, BCC30-33, BCC35 e BCC36) correspondem às 22 espécies atualmente conhecidas e classificadas como Bcc. Linhagens de *B. cepacia* analisadas se agruparam nos clusters BCC07, BCC09-BCC12 e BCC32, sendo que neste último está a espécie representativa ATCC 25416T. Provavelmente as linhagens dos demais clusters (BCC07, BCC09-BCC12) representam cinco novas espécies separadas de Bcc, pois cada uma delas possui uma espécie muito distante da *B. cepacia* representativa ATCC 25416T. Fica bastante evidenciado a falta de elucidação da taxonomia atual de *B. cepacia*, sendo necessária uma reforma na classificação de espécies previamente identificadas como *B. cepacia* (JIN *et al.*, 2020).

Figura 1.2 - Relação filogenética de 116 genomas de linhagens pertencentes ao Bcc. A árvore filogenética foi construída com base na sequência de genes ortólogos de cópia única (denominada de "*species tree*" pelos autores). Organização filogenética dos 36 clados definidos pela análise do genoma (BCC01 a BCC36), agrupamento em cores apenas para os calos com pelo menos duas linhagens bacterianas. Os clados com apenas um membro apresentam fundo branco. A identificação das linhagens que compõem os clusters ocorre pela inicial BCC seguida do número do clado ao qual foi classificada (01 a 36) antes do cógido correspondente à linhagem (por exemplo, BCC08-J2315 presenta uma linhagem do cluster BCC08 anteriormente identificada como *B. cenocepacia* J2315). Legenda de cores à esquerda apenas para clusters que correspondem às espécies conhecidas de Bcc com mais de um membro dentro do cluster. As espécies representativas dos clados estão destacadas com uma estrela azul, e sua identificação está ao lado da estrela



FONTE: adaptado de Jin et al. (2020)

Os clusters BCC05 e BCC08 compreendem, respectivamente, aos genomovares IIIA e IIIB (ambas *B. cenocepacia*) são divergentes, porém intimamente relacionados. Sendo BCC05 representativa da tradicional linhagem *B. cenocepacia* enquanto BCC08 deveria ser reclassificada como nova espécie, apesar de conter a linhagem representativa *B. cenocepacia* J2315 (Figura 1.2) (JIN *et al.*, 2020).

Nove clusters monofiléticos sem linhagem representativa provavelmente representam as espécies, *B. anthina* (BCC03), *B. diffusa* (BCC15), *B. dolosa* (BCC16), *B. latens* (BCC20), *B. metallica* (BCC21), *B. pseudomultivorans* (BCC24), *B. seminalis* (BCC28), *B. stagnalis* (BCC31) e *B. territorii* (BCC33). Os 14 clusters (BCC02, BCC05-07, BCC09-13, BCC18-19, BCC26, BCC27 e BCC34) restantes foram considerados potenciais novas espécies (JIN et al., 2020). Visto que novas espécies de Bcc, continuamente, são descritas, como *B. contaminans, B. lata* (antigo táxon K), *B. stagnalis, B. territorii* (antigo grupo B e L), e recentemente *B. catarinensis*

(anteriormente *Burkholderia* sp. 89) (VANLAERE *et al.*, 2009; DE SMET *et al.*, 2015; BACH *et al.*, 2017).

A alta adaptação diante de mutações traduzida em excepcional plasticidade genotípica e fenotípica é uma característica marcante do grupo (MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005), tornando-o capaz de suportar diversos estresses ambientais e podendo habitar os mais diversos ambientes (DREVINEK *et al.*, 2008).

B. cepacia, B. cenocepacia, B. vietnamiensis e *B. ambifaria* são espécies representativas de *Burkholderia* que habitam a rizosfera das plantas (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001; MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005; CHIARINI et al., 2006; COMPANT et al., 2008), enquanto *B. cepacia, B. cenocepacia, B. vietnamiensis, B. anthina e B. seminalis* são comumente encontradas em ambientes aquáticos (CHIARINI et al., 2006; FANG et al., 2011). Algumas bactérias podem também proliferar em raízes de espécies vegetais com relevância agrícola, como arroz (*B. vietnamiensis*), ervilha (*B. ambifaria*) e trigo (*B. cepacia* e *B. cenocepacia*) (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008).

Já foi relatado o envolvimento de espécies de Bcc na produção de biopesticidas com ação protetiva às espécies vegetais contra outras bactérias, protozoários, nematoides e doenças causadas por fungos (COMPANT *et al.*, 2008; EBERL; VANDAMME, 2016). Devido à sua diversidade metabólica, alguns isolados de *Burkholderia* podem degradar compostos xenobióticos e poluentes orgânicos, incluindo constituintes de óleos crus, pesticidas, ftalatos, e solventes, como tricloroetileno (TCE) (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001; MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005).

Apesar do grande interesse biotecnológico na utilização de *Burkholderia* para o controle biológico, promoção de crescimento vegetal e biorremediação, a existência do potencial patogênico dessas espécies levanta muitas preocupações (COMPANT *et al.*, 2008). Chiarini *et al.* (2006) mostraram a possível troca de material genético *in vitro* entre espécies/linhagens do complexo, apesar desta ocorrência ainda não ter sido registrada em condições naturais, acredita-se que devido à proximidade filogenética das espécies do Bcc, a alternância de uma linhagem exclusivamente ambiental para patogênica possa ocorrer.

LiPuma *et al.* (2002) mostraram que não é possível distinguir geneticamente uma linhagem de *B. cenocepacia* (B. cepacia genomovar III) isolada do solo de uma linhagem responsável por causar um quadro de infecção generalizada em pacientes com fibrose cística. Assim, linhagens do Bcc patogênicas para humanos não diferem das linhagens ambientais.

Além disso, foi demonstrada a presença de bactérias pertencentes ao Bcc em locais os quais as pessoas estão em contato regularmente, como *playgrounds*, campos de atletismo, parques, trilhas para caminhadas, pátios residenciais e jardins, além de solo e rizosfera (MILLER; LIPUMA; PARKE, 2002). Devido à grande semelhança entre as bactérias do Bcc e a falta de métodos de identificação com alta sensibilidade e especificidade, a taxonomia das espécies que compõem o complexo permanece desconhecida e controversa, embora muitos já foram os esforços feitos para elucidar a complexidade taxonômica desse grupo (JIN *et al.*, 2020).

<u>1.1.3 Interações envolvendo Burkholderia</u>

Nas últimas décadas tem se observado que a maioria dos organismos são hospedeiros de um consórcio de micro-organismos, o microbioma. A relação hospedeiro-microbioma é bem complexa e nem sempre é benéfica (CANI, 2018). As interações podem variar de positivas a negativas dependendo do contexto ambiental e outros fatores (BRONSTEIN, 1994), como a presença de outros organismos (RUDGERS; STRAUSS, 2004), e a história evolutiva da relação (ISHIKAWA *et al.*, 2016).

Uma das características mais atraentes desse grupo bacteriano é a diversidade de organismos com a qual os seus membros podem se associar, bem como os papéis contrastantes que eles podem desempenhar, variando de patógenos virulentos a mutualistas obrigatórios (KALTENPOTH; FLOREZ, 2019) (Figura 1.3). Frequentemente são feitos estudos de *Burkholderia* na produção de bioativos, compostos com potencial valor para aplicações biotecnológicas e farmacêuticas (DEPOORTER *et al.*, 2016).

Figura 1.3 - Interações estabelecidas por *Burkholderia* spp. no ambiente com diversos organismos (insetos, plantas, fungos e humanos). As associações descritas podem ser benéficas (simbiose) para diversos insetos como percevejos, besouros e formigas, plantas como *Mimosa* sp. e cana-de-açúcar, bem como fungos como o shimeji, aproveitando-se de suas hifas para transporte e dispersão. No entanto, *Burkholderia* spp. é bastante estudada devido à sua característica patogênica, podendo causar doenças em humanos (imunocomprometidos), diversos animais e plantas (como arroz, orquídea, damasco etc)



FONTE: Tsui (2021)

Acredita-se que essa capacidade também possa ter impulsionado a evolução de associações simbióticas com uma variedade de hospedeiros. *Burkholderia* spp. são abundantes no solo onde podem se associar a uma ampla gama de plantas (ELLIOTT *et al.*, 2009; CARLIER; EBERL, 2012), invertebrados (KIKUCHI; MENG; FUKATSU, 2005) e fungos (WARMINK *et al.*, 2009; UROZ *et al.*, 2012; SCHERLACH *et al.*, 2013). A presença da comunidade microbiana associada a animais e plantas pode conferir proteção contra patógenos, aumentar a absorção de nutrientes, além de interferir em outros aspectos fisiológicos do hospedeiro (BRAGA; DOURADO; ARAÚJO, 2016).

Embora as espécies do gênero *Burkholderia* s.str. sejam mais comumente associadas à patogenicidade, existem evidências de interações mutualísticas com insetos e contribuições para a saúde de espécies vegetais. Sugerindo que a virulência é um estado variável entre os membros deste clado, com o potencial para mudanças dinâmicas no estilo de vida. Espécies fitopatogênicas dispõem de um amplo espectro de fatores extracelulares, permitindo o comportamento patogênico (GONZALEZ; VENTURI; ENGLEDOWN, 2007). Várias dessas espécies, incluindo *B. seminalis, B. gladioli, B. glumae e B. plantarii* são agentes causadores, reconhecidos, de doenças em plantas (COMPANT *et al.*, 2008; LOU *et al.*, 2011; GONZÁLEZ-TEUBER; KALTENPOTH; BOLAND, 2014).

Outras espécies desse clado podem ser patógenos primários de humanos e animais (CHEWAPREECHA *et al.*, 2017) ou patógenos humanos oportunistas que causam infecções em pacientes imunocomprometidos (VIAL *et al.*, 2011). Curiosamente, algumas linhagens estreitamente relacionadas também são capazes de promover o crescimento vegetal, de forma direta, pela alteração dos níveis de etileno ou fixação de nitrogênio ou indiretamente via produção de compostos antimicrobianos que reprimem patógenos vegetais transmitidos pelo solo (VIAL *et al.*, 2011). Conhecer os mecanismos envolvidos nessas interações microbianas é uma ferramenta importante para o desenvolvimento de agentes e/ou condições que possam prevenir ou estimular a formação de comunidades microbianas em um determinado hospedeiro (BRAGA; DOURADO; ARAÚJO, 2016).

Espécies do gênero *Burkholderia*, podem colonizar os mais variados ambientes, apresentando diferentes estilos de vida em uma única espécie, como observado em *B. pseudomallei*, uma bactéria saprofítica de vida livre, também capaz de causar melioidose. Além de patogênica a humanos, *B. pseudomallei* pode também colonizar diversos animais (ELSCHNER *et al.*, 2014). *B. mallei* já é uma espécie bastante virulenta, por apresentar comportamento patogênico animal obrigatório, ser o agente causal do mormo, doença que debilita e pode causar morte em equídeos (BERNHARDS *et al.*, 2016).

As associações mais estudadas de insetos com *Burkholderia* correspondem àquelas que envolvem percevejos herbívoros (Hemiptera, Pentatomomorpha) (KIKUCHI; HOSOKAWA; FUKATSU, 2011). *Burkholderia* simbiontes vivem em criptas ou túbulos na região M4 do intestino dessas superfamílias de percevejos, Lygaeoidea (incluindo Idiostoloidea), Coeroidea e Pyrrhocoroidea (KIKUCHI; HOSOKAWA; FUKATSU, 2005; 2011; SUDAKARAN *et al.*, 2015; SUDAKARAN; KOST; KALTENPOTH, 2017). Apesar da ocorrência generalizada de associações simbiótica envolvendo percevejos herbívoros-*Burkholderia*, trata-se de uma interação evolutivamente frágil, visto que são registradas muitas transições, bem como outras associações simbióticas não envolvendo o gênero *Burkhoderia* (KALTENPOTH; FLOREZ, 2019).

A compreensão da contribuição de *Burkholderia* para o metabolismo de seus hospedeiros percevejos permanece incompleta. Alguns estudos mostraram que a privação da associação simbiótica com *Burkholderia* levou a um desenvolvimento retardado, sobrevivência prejudicada e/ou tamanho adulto reduzido em percevejos, indicando, provavelmente, o fornecimento de um benefício nutricional (KIKUCHI; HOSOKAWA; FUKATSU, 2007; BOUCIAS *et al.*, 2012; GARCIA *et al.*, 2014) através do fornecimento de aminoácidos essenciais ácidos e / ou vitaminas. Entretanto, a confirmação dessa hipótese necessita de evidências experimentais (KIKUCHI; HOSOKAWA; FUKATSU, 2011).

O estabelecimento da interação pode ocorrer em diferentes estágios do ciclo de vida do inseto hospedeiro de *Burkholderia* spp.. Em *Gossyparia spuria* e *Acanthococcus aceris*, hemípteros da superfamília Coccoidea, a bactéria se instala em células de gordura e é transmitida verticalmente do inseto progenitor para a prole (MICHALIK *et al.*, 2016). O percevejo-oriental (praga de cana-de-açúcar), *Cavelerius saccharivorus,* também recebe o seu simbionte *Burkholderia* sp. via transmissão vertical (ITOH *et al.*, 2014). O popular percevejo, *Physopelta gutta,* também tem uma interação estabelecida com *Burkholderia* spp., porém, nesse caso, a transmissão não ocorre verticalmente e sim a cada geração de hospedeiro (TAKESHITA *et al.*, 2015).

São conhecidas seis espécies de besouros da subfamília Lagriinae (Tenebrionidae) que se associam simbioticamente com *B. gladioli* (FLOREZ *et al.*, 2017). Trata-se de uma interação envolvendo exclusivamente fêmeas adultas desses besouros, elas abrigam os simbiontes extracelularmente em glândulas acessórias emparelhadas do sistema reprodutor. A transmissão ocorre verticalmente em *Lagria villosa* e *Lagria hirta*, ou seja, da mãe para a prole (FLOREZ; KALTENPOTH, 2017; FLOREZ *et al.*, 2017). Aparentemente *Burkholderia* spp. simbiontes de besouros apresentam papel fundamental para a defesa, visto que na ausência de *Burkholderia* spp., observa-se um crescimento de fungos nos ovos de

L. villosa, trazendo sérias consequências para a sobrevivência de jovens larvas (FLOREZ et al., 2017).

Em se tratando de associações com insetos, Burkholderia sp. participa de um consórcio bacteriano que habita um órgão (formato de bolsa) localizado entre o intestino médio e o intestino de formigas Tetraponera binghami (VAN BORM et al., 2002). A linhagem está estreitamente relacioada à membros do gênero Paraburkholderia e reside extracelularmente nesta estrutura junto com Rhizobium, Methylobacterium e Pseudomonas, e uma linhagem filogeneticamente próxima a Flavobacterium. Todas essas linhagens estão relacionadas a bactérias envolvidas na formação de nódulos radiculares em plantas, capazes de fixar nitrogênio (STOLL et al., 2007). Na verdade, a fixação de nitrogênio por simbiontes bacterianos têm sido importantes para a adoção de um estilo de vida herbívoro em numerosas espécies de formigas (RUSSELL et al., 2009). Em formigas Atta sexdens rubripilosa, B. cenocepacia secreta um potente agente antifúngico que inibe a germinação dos fungos entomopatogênicos como Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae, Verticillium lecanii e Escagarovopsis weberi, sem causar qualquer prejuízo ao fungo Leucoagaricus gongylophorus (simbionte de Atta sexdens rubripilosa) (SANTOS et al., 2004).

As interações de *Burkholderia* spp. com fungos podem ser particularmente relevantes, visto que podem ser interações antagônicas ou mutualísticas. A atividade antagônica de *Burkholderia* está bem descrita e majoritariamente se deve à produção de diferentes compostos antifúngicos (LEWENZA; SOKOL, 2001; PARTIDA-MARTINEZ; HERTWECK, 2007; SCHMIDT *et al.*, 2009) com princípios ativos que servem também para inibir uma ampla gama de fungos fitopatogênicos (QUAN *et al.*, 2006; KILANI-FEKI *et al.*, 2011; GROENHAGEN *et al.*, 2013). Apesar disso, há relatos de *Burkholderia* spp. estabelecendo interações simbióticas e/ou mutualísticas com fungos, como descrito entre *B. terrae* e *Lyophyllum* sp. (grupo dos fungos shimeji pertencente à ordem Agaricales). Na interação, *B. terrae* é capaz de (i) colonizar as hifas e usá-las para transporte e dispersão (WARMINK *et al.*, 2011), (ii) sobreviver melhor em solos ácidos (NAZIR *et al.*, 2009; NAZIR *et al.*, 2010b, 2013; STOPNISEK *et al.*, 2016). Espécies comumente encontradas no solo,
Burkholderia glathei, B. terrae, B. fungorum e B. phytofirmans podem interagir e dispersar com Alternaria alternata, Fusarium solani e Rhizoctonia solani (STOPNISEK et al., 2016).

O fungo *Rhizopus microsporus* (fitopatógeno de milho, girassol e arroz pertencente a ordem Mucorales) apresenta uma interação intracelular com a simbionte *B. rhizoxinica,* que produz o policetídeo macrocíclico rizoxina, responsável por causar sintomas de doenças em plantas de arroz (PARTIDA-MARTINEZ; HERTWECK, 2005), por meio da paralisação eficiente da divisão celular vegetal. Curiosamente, *R. microsporus* não é capaz de se reproduzir vegetativamente de forma independente na ausência de *B. rhizoxinica* (PARTIDA-MARTINEZ *et al.*, 2007), sugerindo que a estratégia mutualística existente para infectar o arroz, levou a uma associação fungo-bactéria mutuamente dependente. Além de *B. rhizoxinica*, o fungo *R. microsporus* apresenta um segundo endossimbionte, *B. endofungorum*, que produz o composto tóxico ciclopeptídeo rizonina, cujo papel ecológico permanece desconhecido (PARTIDA-MARTINEZ *et al.*, 2007).

Interações com plantas também são observadas, seja na forma de endossimbionte ou fitopatógeno, *Burkholderia* spp. podem estar associadas às plantas (COENYE; VANDAMME, 2003). O grau de dependência da bactéria à planta hospedeira é bastante variável, desde linhagens que vivem livremente na rizosfera, estilo de vida endofítico, nodulantes de leguminosas a formas mais intrigantes como a simbiose foliar obrigatória. O número de estudos isolando espécies de *Burkholderia* na superfície de diversas plantas têm sido frequente (WEISSKOPF; HELLER; EBERL, 2011; DA SILVA *et al.*, 2014; BULGARI *et al.*, 2014; CARREL; FRANK, 2015; BANIK; MUKHOPADHAYA; DANGAR, 2016).

Nesse aspecto, a bactéria *B. phytofirmans* PsJN aparentemente é a linhagem mais estudada. Esse endófito foi originalmente isolado de raízes de cebola, mas posteriormente demonstrou capacidade de colonizar endofíticamente várias espécies vegetais (SESSITSCH *et al.*, 2005; COMPANT *et al.*, 2005). Curiosamente, *B. phytofirmans* não só é capaz de proteger a planta hospedeira contra patógenos (por meio de um mecanismo ainda desconhecido), mas também é capaz de aumentar a resistência ao estresse, particularmente contra baixas temperaturas, alto teor de sal e seca (SHEIBANI-TEZERJI *et al.*, 2015; PINEDO *et al.*, 2015; SU *et al.*, 2015).

A maioria das *Burkholderia* que se associam às plantas não apresentam patogenicidade, podendo estabelecer relações neutras e/ou benéficas com seus hospedeiros (DE COSTA; ERABADUPITIYA, 2005). Várias espécies de *Burkholderia* estabelecem simbiose com plantas das famílias Rubiaceae e Primulaceae, onde acredita-se que o metabolismo secundário bacteriano desempenha um papel importante nessas interações (PINTO-CARBO *et al.*, 2018). Esses simbiontes residem em nódulos e folhas e podem ser transmitidos verticalmente por meio das sementes e, em seu genoma possuem clusters biossintéticos de moléculas que podem desempenhar papel na proteção da planta hospedeira. Muitas das espécies simbiontes de Rubiaceae sintetizam o composto kirkamida, tóxico para artrópodes e, portanto, poderiam conferir defesa anti-herbivoria (PINTO-CARBO *et al.*, 2016).

Luvizotto *et al.* (2010) encontraram 39 isolados de *Burkholderia* em raízes de cana-de-açúcar, dos quais 19 foram isolados da rizosfera. Foi observado que 95% desses isolados apresentaram capacidade de fixar de nitrogênio, 84% de inibir *Xanthomonas albilineans* e 47% de produzir sideróforos. Os autores sugeriram que embora a maioria das espécies de *Burkholderia* pertençam ao grupo Bcc, elas poderiam ser utilizadas como promotores de crescimento vegetal e agentes de biocontrole.

Acredita-se que exista um processo de co-evolução entre *Burkholderia* spp. e leguminosas do gênero Mimosa (COMPANT *et al.*, 2008) considerando a alta frequência de isolamento de bactérias desse gênero nesse clado vegetal (CHEN *et al.*, 2005a, 2005b; CHEN *et al.*, 2007). Nos biomas brasileiros Cerrado e Caatinga, 50 bactéria isoladas de *Mimosa* spp. foram identificadas como *Burkholderia* sp. (BONTEMPS *et al.*, 2010).

A diversidade de *Burkholderia* spp. presente na rizosfera pode ser afetada por práticas de manejo do solo e cultura, assim como os próprios padrões de uso da terra. É possível que tanto a diversidade de *Burkholderia* spp. como a colonização de plantas em diferentes localizações geográficas estejam relacionadas à atividade humana. Além disso, é provável que algumas plantas apresentem certa preferência por determinadas espécies de *Burkholderia* (SUÁREZ-MORENO *et al.*, 2012).

Bactérias rizosféricas com capacidade de colonizar o tecido interno da planta, estabelecendo-se no sistema vascular, formam a população endofítica em diversos órgãos vegetais (COMPANT *et al.*, 2008; SUÁREZ-MORENO *et al.*, 2012). Bactérias endofíticas podem beneficiar a planta, por meio da produção de hormônios, solubilização de fosfato, produção de sideróforos, inibição de fitopatógenos, entre outras formas (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010).

Apesar de parecerem inúmeras as interações microbianas que *Burkholderia* spp. podem estabelecer com fungos, plantas e insetos, acredita-se que existam muitas outras interações com muitos outros organismos a serem desvendadas. Até o momento, o conhecimento deve ser apenas da ponta do *iceberg* (sobre *Burkholderia* e interações ambientais) e muitas associações ainda serão descobertas no futuro (EBERL; VANDAME, 2016) e, em parte, esta ampla capacidade de estabelecer esttas interações está relacionada ao seu genoma com grande variação e plasticidade.

1.1.4 Importância biotecnológica de Burkholderia

Burkholderia spp. tem sido estudadas para diversos fins, como manejo agrícola (SALLES *et al.*, 2006), biocontrole (YANG *et al.*, 2008), biodegradação (VU; MU; MOREAU, 2013), biorremediação (ANDREOLLI *et al.*, 2011) degradando compostos recalcitrantes em herbicidas e pesticidas, na indústria para a produção de biopolímeros (TABACCHIONI *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2014) e promoção de crescimento vegetal (PAUNGFOO-LONHIENNE *et al.*, 2014) por meio de fixação biológica de nitrogênio (MARTÍNEZ-AGUILAR *et al.*, 2013) e produção de fitohormônios (PERIN *et al.*, 2006). Essas potenciais aplicações são de grande interesse para fins agrícolas, visto que *Burkholderia* está entre os táxons bacterianos dominantes na rizosfera de culturas importantes, incluindo arroz, milho, ervilha, algodão, café (TABACCHIONI *et al.*, 2002, VIAL *et al.*, 2011) e cana-de-açúcar (LUVIZOTTO *et al.*, 2010).

A capacidade de promoção de crescimento vegetal de *Burkholderia* spp. já foi anteriormente descrita (PAUNGFOO-LONHIENNE *et al.*, 2014), bem como

atividade antifúngica contra fungos patogênicos *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Alternaria* sp. e *Rosellinia* sp. em experimentos *in vitro* e *in vivo* (DEVI *et al.*, 2015). *B. cepacia* é capaz de degradar compostos aromáticos como fenol e tolueno, além de compostos halogenados como tricloroetileno, uma substância tóxica e cancerígena presente em solo e águas poluídas (LANDA *et al.*, 1994; SCHMIDBERGER *et al.*, 2005).

As linhagens não patogênicas de *Paraburkholderia* apresentam efeitos benéficos em plantas, como fixação de nitrogênio em nódulos de raízes de leguminosas, degradação de compostos aromáticos, solubilização de fosfato, ou indução de resistência ao estresse (SUÁREZ-MORENO *et al.*, 2012). Além disso, isolados de musgos apresentam a capacidade de produzir compostos antifúngicos com poteential para o biocontrole na agricultura, ainda assim, esse uso acarreta riscos devido ao potencial de virulência para outros eucariotos (EBERL; VANDAMME, 2016).

Alguns isolados agrupados no gênero *Caballeronia* (anteriormente classificado como grupo glathei), que abriga espécies ambientais comuns no solo ou água (BEUKES *et al.*, 2017), já foram descritos como simbiontes obrigatórios de nódulos foliares de várias espécies de plantas (PINTO-CARBO *et al.*, 2018).

Bactérias do Bcc possuem caracteríticas interessantes para o controle biológico de patógenos de plantas de interesse agrícola, uma vez que *Burkholderia* spp. produzem uma série de compostos antimicrobianos contra bactérias e fungos (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001). A linhagem R456 de *B. seminalis* isolada da rizosfera de arroz, tem capacidade de proteger mudas de arroz contra o patógeno *Rhizoctonia solani* (LI *et al.*, 2011, 2014). Considerando que, espécies do gênero *Bukrholderia* apresentam uma ampla versatilidade nutricional devido à plasticidade de seus genomas e sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes (COMPANT *et al.*, 2008), a distribuição cosmopolita em vários nichos ecológicos permite que essas bactérias sejam encontradas no solo (YOO *et al.*, 2007) ou em solo contaminado (VANLAERE *et al.*, 2008); em água doce ou salgada (LIM; BAEK; LEE, 2008); em todas as partes das plantas (AIZAWA *et al.*, 2011), como simbionte (SINGH *et al.*, 2006) ou patógeno (LI *et al.*, 2010); em várias espécies animais (ELSCHNER *et al.*, 2014); em humanos e em ambientes hospitalares (KHOSRAVI *et al.*, 2014).

Visto a sua ampla distribuição, o controle biológico por meio de *Burkholderia* spp. representa uma alternativa com grande potencial para substituir (pelo menos parcialmente) a utilização de defensivos agrícolas (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001). Além disso, a colonização da rizosfera de diversas culturas (milho, trigo, arroz, ervilha, girassol e rabanete) já foi descrita, associada a um aumento do crescimento vegetal bem como redução da presença de espécies patogênicas (COENYE; VANDAMME, 2003; CHIARINI *et al.*, 2006).

Ao longo dos anos, tornou-se bastante evidente o fato de que *Burkholderia* é um gênero microbianao com enorme potencial biotecnológico, com espécies que produzem uma grande variedade de enzimas hidrolíticas comercialmente importantes e substâncias bioativas, que promovem o crescimento e saúde vegetal, além de poderem degradar vários poluentes recalcitrantes. Apesar disso, o seu uso no campo agrícola e industrial é severamente limitado devido à potencial ameaça que algumas linhagens representam para a saúde humana (MAHENTHIRALINGAM; URBAN; GOLDBERG, 2005). Assim, somente estudos que identificam os mecanismos envolvidos nas diferentes estratégias ecológicas poderão determinar a segurança de linhagens de grande potencial biotecnológico. Muitos foram os esforços até o momento para realizar uma precisa discriminação entre linhagens ambientais e benéficas (*the good*) e clínicas, potenciais causadoras de doenças (*the bad*) (BALDWIN *et al.*, 2007; MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008; EBERL; VANDAME, 2016).

Os esforços ganharam apoio recentemnte, com a identificação de um número considerável de espécies novas em amostras ambientais, todas com potenciais valiosos traços benéficos. Essas espécies são consideradas seguras para aplicações, já que raramente são descritas em relatórios clínicos que indicam risco para a saúde humana (EBERL; VANDAME, 2016).

1.1.4.1 *Burkholderia* como agente de controle biológico

Doenças e pragas podem causar a perda de 17-30% da safra das principais culturas como, trigo, arroz, milho, batata e soja em escala global (SAVARY *et al.*,

2019). Tornar o controle de doenças em plantas eficiente é fundamental para que a produção de alimentos possa ser continuada e atenda a demanda mundial (VALIN *et al.*, 2014). Nesse contexto, o controle biológico ou biocontrole corresponde ao uso de (micro) organismos (de ocorrência natural) para controlar doenças ou pragas de plantas (EILENBERG *et al.*, 2001; FRAVEL, 2005). Bactérias, fungos, vírus, leveduras e protozoários podem ser agentes de controle biológico (BCA *- Biocontrol agent*) de doenças de plantas de forma direta ou indireta (KÖHL *et al.*, 2019).

A forma direta implica em um efeito antagônico direto do BCA sobre o patógeno, via parasitismo, antibiose ou competição (nutrientes ou locais). Na forma indireta, o BCA induz respostas mediadas por plantas permitindo que a planta reaja com mais rapidez e eficiência após ataque de patógenos (VOS *et al.*, 2015). No caso da antibiose, o BCA precisa ser capaz de produzir compostos antimicrobianos, como enzimas de degradação da parede celular (quitinases e glucanases; hidrolases de mureína) e compostos voláteis ou não voláteis (pironas, butenolidos, iturina, terpenóides, sideróforos e peptaibóis) (VINALE *et al.*, 2008; VOLLMER *et al.*, 2008; MUTAWILA *et al.*, 2016; CAO *et al.*, 2018).

Embora *Burkholderia* spp. endofíticas ou fixadoras de nitrogênio apresentem um grande potencial como agentes de promoção de crescimento vegetal e biorremediação, é importante destacar que em termos de biocontrole, a propriedade mais notável que o gênero apresenta é referente à produção de diversos compostos com potente ação antifúngica (VIAL *et al.*, 2007; SCHMIDT *et al.*, 2009). Uma série de linhagens do complexo já foram registradas pela *United States Environmental Protection Agency* (EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) na década de 1990 como agentes de biocontrole contra fungos fitopatogênicos, como Deny®, Blue Circle® e Intercept®. No entanto, esses produtos foram retirados do mercado após uma avaliação de riscos e a EPA colocou uma moratória no registro de produtos contendo espécies Bcc (https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2004-09-29 / pdf / 04-21695.pdf) (EBERL; VANDAMME, 2016).

Devido ao risco à saúde humana imposto pelas linhagens patogênicas do grupo Bcc (*Burkholderia* s.str.), existe uma expectativa de que espécies de Paraburkholderia possam substituir o papel dessas linhagens produtoras de antifúngicos e possam ser utilizadas comercialmente como BCA. Porém, existem poucas Paraburkholderia potencialmente úteis nesse sentido (EBERL; VANDAMME, 2016). Até o momento, apenas três espécies, *B. phenazinium, B. megapolitana e B. bryophila* (todas isoladas de musgo) (VANDAMME *et al.*, 2007) apresentam atividade antifúngica. Contrastando com o Bcc que possui muitas linhagens (muitas sendo patogênicas humanas e de plantas) que exibem uma excelente atividade de biocontrole (SCHMIDT *et al.*, 2009). Dentre os compostos antifúngicos produzidos por *Burkholderia* spp., podem ser destacados, pirrolnitrinas, fenazinas, cepacidinas, lipopeptídeos, ramnolipídeos, sideróforos, entre outros (ARAÚJO; ARAÚJO; EBERLIN, 2017).

A maioria dos compostos antifúngicos podem apresentar efeitos tóxicos gerais em organismos eucarióticos, contribuindo para a virulência de uma linhagem. A *B. phenazinium* produz um composto denominado fenazina iodinina, que além de alto nível de ação antimicrobiana, também apresenta atividade citotóxica (TURNER; MESSENGER, 1986 apud EBERL; VANDAMME, 2016). Dessa forma, embora o composto possa ter um grande valor para finalidades clínicas (como o tratamento de leucemia) (SLETTA *et al.*, 2014) não se mostra muito útil em termos de aplicação em controle biológico (EBERL; VANDAMME, 2016).

A espécie fitopatogênica *B. gladioli* produz uma variedade de metabólitos secundários com ação antifúngica e antibacteriana. Neste contexto, a ladriamida é um policetídeo com ação antifúngica que se assemelha a compostos defensivos produzidos em poríferos (esponja do mar) (ANGUS *et al.*, 2014). Além disso, *B. gladioli* simbionte do besouro *L. villosa*, é capaz de produzir compostos com ação antimicrobiana, como o sinapigladiosídeo (BOCHKAREVA *et al.*, 2018), lagrieno (BEUKES *et al.*, 2017), carioinencina (BOUCIAS *et al.*, 2012), bem como a toxoflavina (BONGRAND; RUBY, 2019; FLOREZ *et al.*, 2017b). Curiosamente, o último composto está associado à virulência de *B. gladioli* e *B. glumae* em plantas (LEE *et al.*, 2016).

Mais recentemente, o antibiótico icosalídeo (BRADER *et al.*, 2017) também foi identificado entre os metabólitos produzidos por essa linhagem (e demonstrou a capacidade de inibir a motilidade bacteriana do tipo *swarming* e na colonização do hospedeiro (DOSE *et al.*, 2018). A versatiliade ecológica comumente observada em *Burkholderia* pode ser representada pela linhagem *B. gladioli* isolada de besouro mas que pode colonizar de forma sistêmica a planta hospedeira. Nestes hospedeiros, pode causar redução na produção de sementes pela planta e, aumentar o fitness do inseto hospedeiro, demonstrando capacidade de transição dinâmica entre o estilo de vida na planta e no inseto (KALTENPOTH; FLOREZ, 2019).

Parker et al. (1984) encontraram dois compostos acetilênicos, cepacina A e cepacina B, com atividade antimicrobiana em *B. cepacia* SC11,783 contra *Staphylococcus* sp. e outras bactérias Gram-negativas. A produção de pirrolnitrina por uma linhagem de *P. cepacia* B37w foi associada à inibição dos sintomas de ressecamento da raiz por *Fusarium sambucinum* (BURKHEAD; SCHISLER; SLININGER, 1994). Uma linhagem 5.5B produtora de pirrolnitrinas foi capaz de suprimir a podridão das hastes em flor-de-natal ou *poinsettia* (*Euphorbia pulcherrima*) causada por *Rhizoctonia solani*, ao passo que as linhagens mutantes RR13-1 e UV 19-4, que produziam quantidades 5 mil a 20 mil vezes menor de metabólito, foram menos capazes em inibir a doença (HWANG *et al.*, 2002).

Bevinino et al. (2000) observaram que a linhagem de *B. cepacia* MCI 7, descrita como agente de promoção de crescimento vegetal de plantas de milho, foi capaz de controlar a infecção pelo fungo *F. moniliforme* nos estágios iniciais de crescimento da planta. A linhagem *Burkholderia* sp. 2.2.N foi capaz de inibir o crescimento de *Micrococcus luteus, Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus niger*. Foi observada zona de inibição com frações do sobrenadante, revelando que a atividade antimicrobiana não dependia da presença de células vivas e, sim, de compostos secretados (CAIN *et al.*, 2000).

O controle da podridão em ervilha causada pelos fungos *Pythium aphanidermatum* e *Aphanomyces euteiches* foi avaliado por Heungens e Parke (2000), *B. cepacia* AMMDR1 é capaz de reduzir significativamente a colonização em sementes de ervilha por *P. aphanidermatum* e em raízes por *A. euteiches*.

A presença de sideróforos foi descrita em B. bryophila e B. megapolitana associada com os musgos Aulacomnium palustre, Sphagnum rubellum e *Sphagnum pallustre*. Ambas as espécies exibiram atividade antifúngica e antibacteriana, assim como promoveram o crescimento de alface, tornando-as candidatas para o controle biológico (VANDAMME *et al.*, 2007).

Pandey; Kang; е Maheshwari, (2005) descreveram uma 1aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase produzida por Burkholderia sp. com atividade antagônica contra Rhizoctonia solani e Sclerotinia sclerotiorum. Compostos voláteis produzidos por B. gladioli pv. Agaricicola são capazes de inibir R. solani, assim como F. oxysporum (ELSHAFIE et al., 2012). Burkholderia tropica também demonstrou capacidade de inibição dos fungos Colletotrichum gloesporioides, Sclerotium rolffsi, Fusarium culmorum e F. oxysporum, protegendo o milho contra os ataques destes fitopatógenos (TENORIO-SALGADO et al., 2013).

As linhagens MSh1 e MSh2 de *Burkholderia* sp. produzem compostos antibacterianos ativos contra várias bactérias multirresistentes como *Staphylococcus aureus* (ONG *et al.*, 2014). *Burkholderia gladioli* quando em cocultura com *Rhizopus microsporus* produz um potente antibiótico da família das enaciloxinas, policetídeos com capacidade antifúngica e antibacteriana (ROSS *et al.*, 2014). Essa mesma classe de antibióticos foi produzida por *B. ambifaria* contra *C. albicans* e *S. aureus*, comuns em pacientes com fibrose cística (MAHENTHIRALINGAM *et al.*, 2011).

Não existem relatos na literatura de *Paraburkholderia* spp. causadoras de doenças em humanos (até o momento), sendo possível considerá-las como agentes aplicáveis na agricultura para fins de controle biológico. Com relação a *Burkholderia* spp., pode ser igualmente considerado, uma vez que Deng *et al.* (2016) observaram que *B. contaminans* MS14 apresenta múltiplos genes para biossíntese de antimicrobianos, mas não os principais *loci* genéticos necessários para patogênese. Apesar da grande dificuldade taxonômica existente para o gênero e o status filogenético de uma linhagem possa servir como uma primeira inferência sobre o potencial patogênico, essa relação não está totalmente estabelecida e esclarecida. Assim como várias linhagens dentro do Bcc exibem ótimas propriedades para controle biológico, pode ser que existam *Parabukholderias* patogênicas ainda não descritas (EBERL; VANDAMME, 2016).

Assim, a identificação dos mecanismos moleculares envolvidos no mutualismo e na patogênese poderá permitir a seleção de linhagens seguras para aplicações biotecnológicas.

Dessa forma, independentemente do status filogenético de uma linhagem, sua caracterização completa sempre será necessária para ser considerada segura para ser indicada como BCA. Modelos de infecção bem estabelecidos, como o de camundongos (SOKOL et al., 1999) para testes são necessários para avaliação do potencial patogênico de uma linhagem a ser caracterizada. Além disso, deve ser verificado se esta espécie/linhagem foi isolada em amostras clínicas de pacientes infectados e, somente após estas etapas, iniciar estudos com fins de controle biológico(EBERL; VANDAMME, 2016). A grande maioria das espécies de Burkholderia s. str. são capazes de crescer a 37°C. Neste contexto, Alavi et al. (2014) propuseram, recentemente, que a capacidade de crescer a 37°C poderia ser um método simples de diferenciar linhagens patogências de não patogênicas em Stenotrophomonas maltophilia e S. rhizophila. A linhagem de Paraburkholderia, B. phytofirmans não é capaz de crescer a 37°C, propriedade considerada essencial para infectar e colonizar humanos (ALAVI et al., 2014). Por fim, uma boa linhagem bacteriana para fins biotecnológicos, não deve representar qualquer risco a saúde humana (BERG; MARTINEZ, 2015). Acredita-se que a melhor forma de avaliar o potencial de uma Burkholderia ambiental como agente de biocontrole será realizar (i) testes de infecção em modelos adequados; (ii) preferivelmente hospedeiros mamíferos a 37°C e (iii) idealmente em cenários de infecção multi-espécies, que refletem mais precisamente a situação clínica de forma genuína (EBERL; VANDAMME, 2016).

1.1.5 A espécie B. seminalis

Com base em análises do gene recA, MLST (*Multilocus Sequence Typing*), BOX-PCR e recA RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), Vanlaere et al. (2008) descreveram cinco novas espécies para o complexo *Burkholderia cepacia*, incluindo *B. seminalis*. Cujo nome da espécie ("seminalis") refere-se ao local de isolamento das linhagens clusterizadas neste grupo, sendo a maioria isolada da superfície de sementes. Trata-se de uma bactéria Gram-negativa, aeróbica, não esporulante, com formato de bastonete, formadora de colônias mucóides e majoritariamente com pigmentação amarela em placas de ágar (VANLAERE *et al.*, 2008).

Nesse trabalho de organização e classificação filogenética, os autores obtiveram 19 isolados de *B. seminalis* que se agruparam nas linhagens LMG19587, LMG24067, LMG24271, LMG24272 e LMG24273 (sendo LMG24067, isolada de catarro de paciente com fibrose cística em 1998 nos Estados Unidos, a linhagem representativa). As linhagens foram isoladas de diversas amostras de diversos locais no mundo (Brasil, Portugal, Índia, Tailândia Estados Unidos, Suíça, Filipinas e Hungria), sendo provenientes de pacientes com fibrose cística (LMG24067, LMG24271 e LMG24273), amostra de infecção nosocomial (LMG24067, LMG24271 e LMG24273), cana-de-açúcar (LMG24273) e superfície da semente de arroz (LMG19887 e LMG24271) (VANLAERE *et al.*, 2008).

Dentre essas linhagens estudadas, somente LMG19587 não foi isolada também de amostras clínicas envolvendo infecções hospitalares. As demais linhagens podem ser encontradas tanto no ambiente como associadas à pacientes acometidos por fibrose cística ou até mesmo presente em amostras colhidas após um evento de infecção nosocomial, como LMG24272 (VANLAERE *et al.*, 2008). *B. seminalis* além de já ter sido isolada em amostras de catarro de pacientes com fibrose cística, já foi também descrita como agente causal de podrião bacteriana de damasco na China (LI *et al.*, 2010).

O potencial patogênico de *B. seminalis* foi avaliado utilizando modelos de infecção de *Galleria mellonella*, germinação de alfafa, folhas de alface e modelo animal (rato). Amostras de *B. seminalis* obtidas de água, rizosfera de plantas de arroz e damasco foram utilizadas nessa avaliação e foi observado que *B. seminalis* apresenta fraca virulência nesses modelos avaliados, além disso, as linhagens de *B. seminalis* não foram capazes de colonizar e infectar pulmões de ratos (IBRAHIM et al., 2012).

Hall *et al.* (2015) realizaram um isolamento específico para *Burkholderia* spp. em três estados nos Estados Unidos a fim de encontrar linhagens *de B. pseudomallei* (relacionada a melioidosis) e então compreender a dinâmica de

distribuição dessa espécie no solo. Os autores isolaram duas linhagens de *B. seminalis* (FL-5-4-S10-D0 e FL-5-4-S10-D7) de solo arenoso.

B. seminalis pode promover o crescimento vegetal, aumentando a formação de raízes laterais em tomate (TALLAPRAGADA *et al.*, 2015). A linhagem *B. seminalis* R456 apresenta uma grande atividade antifúngica contra *Rhizoctonia solani*, causador de ferrugem em plantações de arroz representando uma importante ferramenta para o controle biológico desse fungo fitopatogênico, além disso, R456 não se mostrou capaz de causar sintomas de doença nas plantas de arroz (Ll *et al.*, 2011). Por meio da geração de uma biblioteca de mutantes de transposon Tn5, Zhang *et al.* (2020) identificaram 10 possíveis genes relacionados ao antagonismo de *B. seminalis* R456 contra *R. solani*. Entre eles foram observados genes que codificam uma glicosiltransferase, histona H1, peptídeo sintetase não ribossomal, metiltransferase, MnmG, transportador de exportação de sulfato, catalase/peroxidase HPI e CysD.

B. seminalis isolada da rizosfera da palmeira de dendê (*Elaeis guineensis*) é capaz de solubilizar fosfato, representando uma alternativa como biofertilizante para uma agricultura sustentável (BASKARA *et al.*, 2020). A disponibilização de zinco é muito importante em culturas de arroz e, rizobactérias dessa cultura, tais como *B. seminalis* apresentaram um enorme potential em solubilizar o zinco inorgânico *in vitro*, aumentando então a concentração deste mineral para a planta de arroz (BHAKAT *et al.*, 2021).

Dessa forma, a espécie *B. seminalis* pode ser encontrada em diversos hábitats como água (FANG *et al.*, 2011), solo (PANHWAR *et al.*, 2014), plantas (ARAÚJO *et al.*, 2016) e amostras de pacientes com fibrose cística (VANLAERE *et al.*, 2008). Sendo que em plantas, essa bactéria pode estar associada à promoção de crescimento (PANHWAR *et al.*, 2014), controle de necrose em orquídea (ARAÚJO *et al.*, 2016), nodulação radicular (HUANG *et al.*, 2012) ou fitopatogênese, como no caso da podridão de damasco (LOU *et al.*, 2011).

Tendo em vista a proximidade taxonômica de *B. seminalis* com patógenos oportunistas humanos dentro do grupo Bcc, o uso desta bactéria como agente de controle biológico deve ser considerado com cautela. Entretanto, estudos realizados com essa espécie podem ser úteis para guiar pesquisas que buscam a identificação de mecanismos moleculares envolvidos nas interações entre espécies de *Burkholderia* na planta hospedeira e a consequente supressão de doenças causadas por fitopatógenos (ARAÚJO *et al.*, 2016).

1.1.5.1 A linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3

A linhagem TC3.4.2R3 de *B. seminalis* foi isolada endofiticamente de raízes de cana-de-açúcar (MENDES *et al.*, 2007; LUVIZOTTO *et al.*, 2010) (Figura 1.4A) e caracterizada quanto à capacidade de inibir patógenos de cana de açúcar, *Fusarium verticillioides* (Figura 1.4A) e *Xanthomonas albilineans*, promoção de crescimento vegetal (produção de sideróforos, solubilização de fosfato, produção de AIA e fixação de nitrogênio) (LUVIZOTTO *et al.*, 2010). A linhagem TC3.4.2R3 é capaz de inibir o crescimento de *F. verticillioides*, mas não o de *X. albilineans*, produz AIA, solubiliza fosfato, fixa nitrogênio, mas não produz sideróforos (LUVIZOTTO *et al.*, 2010).

Mano (2011) observou que TC3.4.2R3, é capaz de controlar sintomas de necrose foliar em orquídea (Figura 1.4A) e Neves (2011) verificou que essa linhagem também apresenta atividade antifúngica contra *F. oxysporum, F. verticillioides e Ceratocystis paradoxa* e *Phytophthora parasidica*. Assim, uma biblioteca de mutantes Tn5 de *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi construída (Figura 1.4C) para o melhor entendimento dos genes envolvidos nas características de interesse para o controle biológico (NEVES, 2011; ARAÚJO et al., 2016).

Neves (2011) avaliou 600 mutantes para atividade antifúngica e observou que 5,38% apresentou perda da capacidade de inibir o fungo *F. oxysporum*, 17,14% *F. verticillioides* e *C. paradoxa* e 5,71% de inibir *Phytophthora parasidica*. Os genes de tioredoxina, metiltransferase, ferredoxina e glicosiltransferase foram identificados como associados à inibição desses fitopatógenos, sugerindo a síntese de diferentes moléculas com propriedades antimicrobianas no processo. Além disso, o controle biológico da necrose em orquídea está associado à expressão dos genes de uma fosfolipase semelhante à patatina, glicosiltransferase grupo 1, glutamato sintase, transportadores da MFS (Superfamília Facilitadora Principal), desidrogenases, poli-hidroxialcanoatos (PHAs), dentre otros (MANO, 2016). Tendo em vista o interesse nos resultados obtidos anteriormente, o genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi sequenciado (ARAÚJO *et al.*, 2016). A análise mais aprofundada do genoma resultou em um esboço (*draft genome*) com aproximadamente 7,6 Mpb e conteúdo GC de 67,2%. A anotação do genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3 na plataforma Prokka v. 1.5.2 resultou na predição de 6.917 sequências codificantes (CDS) distribuídas em três cromossomos (Figura 1.4B) (ARAÚJO *et al.*, 2016). Os dados são consistentes com outros genomas bacterianos grandes, dentre as CDS em *B. seminalis* TC3.4.2R3, mais de 80% são atribuídas a clusters de genes ortólogos (COGs) que apresentam principalmente sequências anotadas como "Produção de energia e conversão", "Transporte e metabolismo de amoninoácidos" e "Transcrição", além disso, há também alta representatividade na categoria "Função desconhecida" (ARAÚJO *et al.*, 2016).

Araújo et al. (2016) realizaram uma análise comparativa do genoma de *B.* seminalis TC3.4.2R3 com espécies representativas do gênero de *Burkholderia*, sequências de 1.055 genes com homologia em doze linhagens bacterianas foram concatenadas para esta análise comparativa. Neste estudo, *B. seminalis* TC3.4.2R3 agrupou-se dentro do complexo *B. cepacia* (Bcc), no entanto, mostrou-se distinta das demais sequências comparadas nessa análise. A fim de complementar os resultados, os autores realizaram uma análise de sequência de multilocus (MLSA) na qual a linhagem TC3.4.2R3 mostrou-se filogeneticamente mais próxima a um grupo composto por espécies de *B. seminalis* dentro do Bcc (ARAÚJO et al., 2016).

Existe uma grande proximidade filogenética entre TC3.4.2R3 e as demais linhagens clínicas do Bcc, no entanto a virulência dessa linhagem não foi observado em modelo murino, embora a virulência a *Galleria melonella* (Figura 1.4A) seja maior a 37°C (GONÇALVES *et al.*, 2018). Os autores também observaram que a temperatura também regula a síntese de compostos antifúngicos, visto que a 28°C ocorre inibição de fungos e a 37°C essa função é reprimida. Em outro estudo, foi observado que a inibição de *F. oxysporum* por TC3.4.2R3 está associada à produção de pioquelina (ARAÚJO; ARAÚJO; EBERLIN, 2017), além disso, ela também possui atividade de inibição contra os patógenos do cacau *Moniliophthora perniciosa, Phytophthora citrophtora, P.* capsici e P. palmivora sendo a produção de ramnolipídeos (não identificados) disfusíveis os principais metabólitos responsáveis (ARAÚJO *et al.*, 2017).

Figura 1.4 - Representação esquemática de estudos que já foram realizados com a linhagem TC3.4.2R3. **A.** desde o seu isolamento em raízes de cana-de-açúcar, testes para verificar o potencial antagônico contra fitopatógenos, capacidade de controlar sintomas de necrose foliar em orquídeas, virulência em modelo *Galleria mellonella*; **B.** sequenciamento e anotação do genoma completo; e **C.** contrução de biblioteca de mutantes visando a identificação de genes relacionados ao antagonismo contra fitopatógenos e controle de necrose foliar em orquídeas



FONTE: Tsui (2021)

1.1.5.2 O cluster n-TASE em TC3.4.2R3

Mais de 2.750 clusters de genes homólogos estão presentes em todas as linhagens de *Burkholderia* comparadas com TC3.4.2R3 (ARAÚJO *et al.*, 2016). Com base na comparação com *B. cenocepacia* J2315 como genoma de referência, foi observado que 4 genes agrupados (4.378 pb), localizados no cromossomo 1 (posições de 3.050.280 a 3.045.903) não apresentaram sequência correspondente na linhagem referência e nem nas demais *Burkholderia* comparadas. Trata-se de um cluster composto por 4 genes que codificam uma glicosiltrasferase (Bsem_02857), uma metiltrasferase (Bsem_02858), e duas proteínas hipotéticas (Bsem_02859 e Bsem_02860).

O gene Bsem_02857 codificauma proteína da família 2 da glicosiltransferase. As glicosiltransferases (GTFs) são responsáveis por catalizar reações de transferência de resíduos de açúcar, as quais são essenciais na síntese de metabólitos secundários glicosilados, como antibióticos. Essas enzimas também podem estar envolvidas na síntese de inúmeros compostos naturais contendo carbono, como os oligossacarídeos (LIANG; QIAO, 2007).

Essas enzimas podem ser agrupadas em 103 famílias de glicosiltransferases (banco de dados CAZy, 2017). Em *B. seminalis* TC3.4.2R3, foi descrito um gene da glicosiltransferase associado à produção de piochelina e ramnolipídeo (ARAÚJO; ARAÚJO; EBERLIN, 2017). Em *B. cenocepacia*, a glicosiltransferase está presente na glicosilação da flagelina em dez locais diferentes, proporcionando uma estratégia evasiva para infecção bacteriana por meio da redução do reconhecimento da flagelina pelo hospedeiro (HANUSZKIEWICZ *et al.*, 2014).

O gene *bce*E de *B. cenocepacia* codifica uma glicosiltransferase essencial para a síntese de exopolissacarídeo, envolvida na colonização e persistência desta bactéria no hospedeiro (VIDEIRA; GARCIA; SÁ-CORREIA, 2005). Assim, pode-se observar que as glicosiltransferases estão envolvidas na síntese de uma série de compostos importantes para a adaptação e competição das bactérias em seu ambiente.

O gene Bsem_02858 foi anotado como responsável pela codificação de uma S-adenosil-L-metionina: magnésio-protoporfirim IX O-metiltransferase, uma proteína envolvida na catalização de uma reação intermediária na via biossintética da bacterioclorofila na bactéria *Rhodobacter capsulatus* (SAWICKI;WILLOWS, 2007). Geralmente, O-Metiltransferases (OMTs) catalisam a transferência de um grupo metil de S-adenosilmetionina (SAM, Ado-Met) para grupos hidroxila catecólicos, representando as metiltransferases (MTFs) mais bem estudadas (STRUCK *et al.*, 2012).

Metiltransferases podem ser encontradas em animais, plantas e fungos, bem como em bactérias (CHATTERJEE et al., 2015). OMTs de microrganismos têm sido frequentemente caracterizados nas vias biossintéticas de metabólitos secundários, ou têm sido utilizados para as modificações biotecnológicas de uma série de compostos como flavonóides, alcalóides е antibióticos. Consequentemente, um elevado interesse na compreensão da importância biológica dos OMTs microbianos e o estudo de suas propriedades enzimáticas emergiu (DARSANDHARI et al., 2018). Já foi descrito um evento de transferência horizontal de genes envolvidos da bacteriofotossíntese (incluindo o gene de magnésio-protoporfirim IX O-metiltransferase) de *Rhodobacter* sp. para um grupo filogeneticamente distante, Gemmatimonadetes (ZENG et al., 2014)

Araújo et al. (2016) utilizaram o software Alien Hunter (VERENIKOS; PARKHILL, 2006) para detectar regiões genômicas recentemente adquiridas. Eles identificaram 84 regiões adquiridas horizontalmente. Evidenciando assim, que a presença de transferência gênica horizontal (HGT) em TC3.4.2R3, pode ser um importante mecanismo evolutivo que resulta em vantagem competitiva em interações bactéria-hospedeiro e/ou no ambiente.

Com base nessa observação, viu-se uma lacuna a ser preenchida pela história evolutiva desse cluster , visto que não existem, até o presente momento, informações suficientes sobre a organização e função desse cluster (via biossintética envolvida e origem). Assim, para fins de identificação ele foi denominado cluster n-TASE durante este estudo (**n**- para **n**ão identificado e **TASE** - para **t**ransfer**ase**s). Dessa forma, o cluster n-TASE refere-se ao cluster composto pelos 4 genes Bsem_02857, Bsem_02858, Bsem_02859 e Bsem_02860.

Neves (2011) verificou que o mutante M30, cuja inserção do transposon Tn5 ocorreu no gene Bsem_02858, responsável por codificar a metiltransferase, apresentou uma atividade antifúngica defectiva frente ao fungo *F. oxysporum*. Sugerindo uma possível relação desse gene ou do cluster n-TASE em alguma etapa da síntese de compostos antimicrobianos. Entretanto, estudos específicos para elucidar o papel destes genes não foram realizados.

1.1.6 Transferência horizontal gênica do cluster n-TASE

A transferência gênica lateral ou horizontal (LGT ou HGT) é a transmissão de porções do DNA genômico entre organismos por meio de um processo independente da transferência (herança) vertical. Além disso, por meio da HGT, os genomas podem expressar genótipos radicalmente diferentes de linhagens distantes, ou mesmo novos genes com novas funções, é uma importante fonte de inovação fenotípica e um mecanismo de adaptação de nicho (HIRAMATSU *et al.*, 2001).

Os eventos de HGT têm uma importância fundamental para a evolução dos genomas procariontes e também consequências práticas importantes, evidenciadas pela rápida disseminação da resistência aos antibióticos e fatores de virulência (VOS *et al.*, 2015). Devido à importância evolutiva dos eventos de HGT, a acessibilidade de métodos exatos e precisos para identificar rapidamente os genes transferidos horizontalmente é de importância crucial para o estudo e a ampla compreensão dos processos que moldaram os genomas (FLUTRE *et al.*, 2011).

Estudos anteriores destacaram o papel fundamental desempenhado pela transferência horizontal de genes na evolução de *Burkholderia*. Em *Burkholderia xenovorans* LB400, uma linhagem capaz de degradar bifenil policlorado (PCB), aparentemente, a capaciade de degradação de compostos aromáticos foi adquirida por HGT, permitindo sua adaptação a um ambiente com uma fonte de carbono recalcitrante (CHAIN *et al.*, 2006). A linhagem *Burkholderia cepacia* FX5, isolada dos tecidos da raiz de *Zea mays*, é capaz de crescer em fenol e reduzir sua concentração. O fenol e outros compostos aromáticos monocíclicos (MACs) são poluentes altamente solúveis em água e voláteis, e as plantas são incapazes de degradar esses compostos por completo. Um plasmídeo isolado de FX5 possui um gene que codifica a enzima chave nos processos de degradação do fenol, a catecol 2,3-dioxigenase (C23O). Foi comprovado que o gene *C230* pode ser transferido horizontalmente entre bactérias endofíticas e rizosféricas, auxiliando no processo

de biorremediação, uma vez que esses microrganismos podem utilizar os poluentes como fonte de nutrientes (WANG *et al.*, 2007). *B. cenocepacia* J2315, um patógeno humano, contém 14 ilhas genômicas (GIs) que introduziram funções que promovem a sobrevivência e a patogênese no pulmão de pacientes com fibrose cística (HOLDEN *et al.*, 2009).

A Burkholderia gladioli Lv-StB uma linhagem não cultivável, simbiótica protetora de besouros do gênero *Lagria*, produz o policetídeo lagrimida, responsável por proteger a prole de *Lagria villosa* de patógenos fúngicos (FLÓREZ; KALTENPOTH, 2017; FLÓREZ *et al.*, 2017). Curiosamente, a lagriamida é estruturalmente semelhante às bistramidas, compostos defensivos encontrados nos cordados (Chordata). Foi demonstrado que o cluster gênico possivelmente envolvido na biossíntese de lagriamida foi adquirido via HGT, destacando-se o potencial de simbiontes microbianos e transferência horizontal de genes como fontes influentes de inovação ecológica (FLÓREZ *et al.*, 2018).

A análise da história evolutiva por trás da diversidade e patogenicidade de 60 genomas completos de *Burkholderia* revelou que eventos HGT ocorreram extensivamente na evolução adaptativa deste gênero. Também foi observado que o HGT desempenha um papel importante na adaptação e na patogenicidade. A maioria desses genes adquiridos codifica proteínas hipotéticas ou proteínas específicas de *Burkholderia* de função desconhecida, portanto, um melhor entendimento de seu papel na adaptação e divergência de linhagens deve ser alcançado através da análise de coexpressão desses produtos gênicos. A localização desses genes transferidos é frequentemente em pequenos cromossomos e provavelmente foram adquiridos há muito tempo, o que tem contribuído para grandes diferenças entre as espécies (ZHU *et al.*, 2011).

Uma série de estratégias indiretas são necessárias para mostrar de forma convincente, um evento de de HGT, uma vez que são difíceis de comprovar (BUADES; MOYA, 1996). Os dados genômicos são constantemente atualizados e vem aumentando em quantidade constantemente, tornando muito mais viável a avaliação da aquisição de diversidade genética dentro dos organismos via transferência horizontal. No entanto, a identificação de eventos de HGT em genomas bacterianos, ainda não é uma tarefa trivial. Normalmente, as abordagens

são baseadas na análise da composição do DNA, distinguindo DNA exógeno do nativo (incluindo conteúdo de GC, abundância relativa de dinucleotídeo e uso de códons); análise de padrões filéticos incomuns (como classificação inesperada de semelhanças ou conteúdo genético incomum); topologia de árvore filogenética inesperada; e a presença de elementos genéticos móveis (RAGAN, 2001).

1.1.7 Estratégias de mutagênese para o estudo de genes

A manutenção dos processos celulares de forma adequada em um organismo depende do funcionamento de seus genes essenciais nos genomas procarióticos garante a manutenção dos processos celulares, apesar disso não se tem o conhecimento da função de todos esss genes (PEREIRA, 2016). Com o advento do sequenciamento, a quantidade de genomas completos de bactérias patogênicas disponíveis ficou substancialmente maior, gerando concomitantemente um aumento do número de genes, cuja função permanece desconhecida (SAENZ; DEHIO, 2005). Dessa forma, a compreensão do papel e da influência dos genes nos processos biológicos das células bacterianas e sua interação com outros organismos é de fundamental importância (CHRISTEN et al., 2011; PETERS et al., 2016).

A fim de se entender o papel de um gene em um processo biológico ou a sua relação com determinada característica fenotípica, a perturbação ou anulação da expressão do gene de interesse e a posterior observação das consequências que isso provoca (na célula ou no organismo) é uma das estratégias mais utilizadas para estudos de função gênica (PEREIRA, 2016). Dessa forma, o *knockout* ou nocate gênico é a alteração (genética) de um organismo, em que os genes tem a expressão inativada (devido à mutação) ou sua sequência é completamente deletada e portanto não há expressão desse gene (WAH-TANG *et al.*, 2015). Em 1989, foi descrito um método de nocaute (plasmídeo-dependente) em *Escherichia coli*, baseado em dois eventos de recombinação (integração e resolução), resultando na substituição do gene *bolA* (HAMILTON *et al.*, 1989).

O entendimento da função gênica depende da possibilidade de se fazer modificações na sequência de DNA de maneira controlada. Em organismos procarióticos, existem diversas tecnologias acessíveis, fáceis de usar e eficientes no estudo de função gênica baseada na modificação do DNA (SUNG *et al.*, 2001; BAE; SCHNEEWIND, 2006; JIANG *et al.*, 2013). No passado, os nocautes de genes bacterianos eram frequentemente feitos por mutagênese de transposon. Nesse caso, processos para realizar o *screening* (avaliação de coleções de mutantes em busca de fenótipo alterado) de mutantes contedo um nocaute no gene de interesse eram muito laboriosos (SAWITZKE *et al.*, 2013).

A mutagênse aleatória por transposon permite a geração de uma biblioteca de mutantes, cujos fenótipos podem ser buscados de acordo com o interesse de estudo, por exemplo fenótipos bacterianos atenuados em modelo de infecção animal, identificando então os genes e/ou operons relacionados à sobrevivência do hospedeiro infectado (SAENZ; DEHIO, 2005). A geração de biblioteca de mutantes aleatórios pela inserção de transposon é uma estratégia que permite o estudo de uma série de processos fisiológicos. A inserção da sequência de transposon (conhecida) em determinado local do genoma de estudo, leva ao conhecimento da sequência de nucleotídeos das regiões adjacentes, permitindo a identificação dos genes e possíveis vias e características fenotípicas associadas ao gene interrompido (PAJUNEN *et al.*, 2005).

Uma limitação nesse método, se deve à ação da transposase, que acaba tornando os mutantes gerados, geneticamente instáveis, em seu sítio alvo. Para contornar essa limitação, a construção e utilização de mini-transposons (transposons carregados em plasmídeo vetores) tem sido a solução. Uma vez que o gene de transposase seja deslocado para uma posição fora do elemento de transposição, fazendo com que ele perca a capacidade de transposição após ter-se inserido em um novo sítio (ROUW, 2008). Em procariotos, é muito o comum a utilização do transposon Tn5, cuja transposição de Tn5 se dá por um mecanismo de "cortar e colar", onde o transposon é "recortado" do sítio original e "colado" em outro sítio (REZNIKOFF *et al.*, 1999).

Em *B. pseudomallei* K96243, causador de melioidose, foi realizado um estudo relacionado a virulência em modelo de infecção animal, mutantes que aprentaram uma atenuação nos sintomas em camundongos tiveram os genes envolvidos em vários estágios de biossíntese de polissacarídeo da cápsula,

replicação e reparo de DNA, oxidorredutase putativa, transportadores ABC e lipoproteína interrompidos pela inserção do transposon (CUCCUI *et al.*, 2007).

Genes da linhagem TC3.4.2R3 com potencial importância no controle biológico de fungos fitopatogênicos e sintomas de necrose foliar em orquídeas foram identificados e caracterizados por meio de geração de uma biblioteca de mutantes baseada em tranposon (Tn5 mini-transposon). Sendo esse genes, glicosiltransferases, metiltransferases, glutamato sintase, bomba de efluxo de drogas, transportadores, reguladors transcricionais, polihidroalcanoato depolimerase intracelular, reedudtases e proteínas hipotéticas (MANO, 2011; NEVES, 2011; ARAÚJO, 2016).

Por meio da abordagem de sequenciamento (Tn-Seq) em *B. cenocepacia* H111 foram identificados os genes necessários para a tolerância da linhagem aos íons prata e ouro, genes que codificam enzimas do metabolismo da arginina e da biossíntese de citrato foram consideradas importantes para tolerância à prata, enquanto componentes de um transportador ABC e enzimas das vias biossintéticas da cisteína são necessárias para a tolerância ao ouro (GUALDI; EBERL, 2021).

O estudo da função gênica por meio de nocaute pode se dar por técnicas moleculares como mutagênese sítio-dirigida ou via seleção de mutantes naturais. Ao longo dos anos, diferentes técnicas visando a alteração do genoma (*Gene targeting*, ZFNs, TALENs e CRISPR foram sendo desenvolvidas para consolidar a dissecção genética. Mas foram os métodos clássicos de geração de células (nocaute *- gene targeting*) que permitiram a manipulação genética de diversos organismos viabilizando os primeiros e experimentos de supressão e edição de genes (PEREIRA, 2016).

As primeiras abordagens para o processo referido como edição de genoma contavam com o princípio de reconhecimento sítio-específico de sequências do DNA, bem como do estudo de vias naturais de recombinação e reparo no genoma de bactérias e leveduras, tendo revelado que as células têm maquinaria endógena para reparar quebras na dupla fita do DNA (*Double Strand Break* - DSB) que de outra forma seriam letais para esses organismos. Os métodos para introduzir mutações precisas em regiões do DNA foram reconhecidas como uma estratégia importante para engenharia genética (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; KUMAR *et al.*, 2016). Davidson *et al.* (2002) mostraram a utilização de um método baseado em PCR para o estudo de função gênica, esse método depende basicamente de um marcador selecionável para a deleção de cassetes (EL-KIRAT-CHATEL; DEMENTHON; NOËL, 2011). Trata-se de uma metodologia eficiente e facilmente aplicável para diferentes genes usando uma variedade de linhagens e marcadores genéticos, cuja sequência completa é conhecida (DAVIDSON *et al.*, 2002). A sua principal vantagem é de acelerar as etapas envolvidas na substituição dos genes (gene de resistência a antibiótico pelo gene de interesse) (CHOI; SCHWEEIZER, 2005). Além disso, Choi e Schweeizer, (2005) desenvolveram um método para geração de mutantes limpos de *Pseudomonas aeruginosa* baseado na técnica de SOEing (*Splicing By Overlap Extension*) PCR (Horton *et al.*, 1990), que se mostrou efetivo em 25 genes relacionados a fatores de regulação de transcrição da família GntR.

Foi estudado o papel da bomba de efluxo BpeAB-OprB em *B. pseudomallei* na resistência a aminoglicosídeos por meio da técnica de SOEing PCR, mostrando que BpeAB-OprB não está relacionada ao efluxo de aminoglicosídeos, mas é um sistema de efluxo multi-drogas que remove macrolídeos, fluoroquinolonas, teetraciclinas, acriflavinas e também cloramfenicol (MIMA; SCHWEIZER, 2010). Também em *B. pseudomallei*, a SOEing PCR foi utilizada para geração de mutantes dos genes *penA* e *tatABC* relacionados à resistência dessa espécie a antimicrobianos do tipo β-lactamase (RHOLL *et al.*, 2011).

Apesar de ampla utilização (CHOI; SCHWEEIZER, 2005 MIMA; SCHWEIZER, 2010; RHOLL *et al.*, 2011) e relativa economia de tempo (CHOI;SCHWEEIZER, 2005), os métodos de nocaute gênico baseados em PCR e dependentes de ligação ainda são muito laboriosos, devido ao tempo que essa etapa demanda. Assim uma série de projetos comerciais visando o desenvolvimento de processos de clonagem independentes de ligação foram desenvolvidos (ALZARI *et al.*, 2006), como o GatewayTM system, RadianceTM system e In-FusionTM enzyme (BERROW *et al.*, 2007). Além desses sistemas, em 2009 foi desenvolvido o sistema Gibson (GIBSON *et al.*, 2009), que também permite a junção de fragmentos de DNA com sobreposição de sequências sem a necessidade da etapa de ligação.

O termo "gene replacement" para a realização de edição de genomas foi utilizado pela primeira vez em 1979 em levedura (SCHERER; DAVIS, 1979) e desde então o surgimento de novas técnicas moleculares para auxiliar a edição geenômica tem ocorrido com bastante frequência. A utilização de nucleases na edição iniciou com estudos de proteínas (nucleases) denominas Zinc-finger, originando a técnica ZFNs (KIM *et al.*, 1996; BIBIKOVA *et al.*, 2002, 2003). Na sequência, com base em estudos em TALE (*Transcription Activator-Like Effector*), as TALENS ("TALE nucleases") foram desenvolvidas como método de edição genômica (CHRISTIAN *et al.*, 2010). A tecnologia mais recentemente desenvolvida para a edição de genomas, é o CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*), que se baseia no mecanismo de defesa da bactéria (JINEK *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2013; MALI *et al.*, 2013; CONG *et al.*, 2013).

Todos esses sistemas baseados em nucleases (ZFN, TALEN e CRISPR) produzem uma quebra da dupla fita de DNA (DSB) e então a edição do genoma se dá através da participação do sistema natural de reparo na célula, o qual utiliza primordialmente dois mecanismos, a ligação de extremidade não homóloga (NHEJ - *Non Homologous End Joinning*) e a recombinação homóloga (HR - *Homologous Recombination*) (CHAPMAN *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014). Na primeira, as extremidades do DNA são unidas sem um molde, tornando o sistema passível de erro, porém caracteriza-se por ser mais imediato. Já a HR ocorre na presença de um molde, gerando umacópia perfeita deste. Em termos práticos, a tecnologia utiliza-se de vetores (plasmídeos ou vírus) para expressão in vivo dos componentes ou do sistema montado in vitro (CONG *et al.*, 2013) e pode-se ainda utilizar Cas9 intacta ou mutada em uma das atividades (nickase), o que aumenta a especificidade de reconhecimento se sequências no genoma (RAN *et al.*, 2013).

<u>1.1.8 Utilização de modelo Galleria melonella</u>

Atualmente, infecções oportunistas na corrente sanguínea de pacientes aumentaram rapidamente, especialmente em pacientes imunocomprometidos, devido principalmente a novas espécies/linhagens com resistência múltipla a antibióticos (LIN; SCHRANZ; TEUTSCH, 2001; PFALLER, 2012; ZIRKEL *et al.*, 2012). O quadro clínico de pacientes com fibrose cística acometidos por alguma infecção causada por bactérias do Bcc é muito delicado devido ao declínio na função pulmonar associado ao aumento mortalidade e morbidade (LIPUMA *et al.*, 2001).

A capacidade de bactérias do complexo causarem infecções em pacientes com fibrose cística não é espécie-dependente, uma vez que todas as espécies já foram encontradas em amostras recuperadas de indivíduos infectados (SPEERT *et al.*, 2002). No entanto, as diferenças de patogenicidade dentro das espécies que compõem o Bcc não são elucidadas, acredita-se que patógenos oportunistas do Bcc utilizam de fatores de virulência comuns para causar infecções em diferentes organismos (BERNIER *et al.*, 2003).

Com base nesse problema, a comunidade científica procura elucidar os mecanismos de infecções, modelos de experimentação utilizando animais, sendo que camundongos e ratos são os mais utilizados, já que são considerados o padrão ouro para testes de infecção. No entanto existem considerações éticas, logísticas e econômicas, que muitas vezes acabam limitando o seu uso, especialmente se o objetivo do estudo é rastrear um grande número de linhagens patogênicas ou testar uma grande quantidade de diferentes substâncias ou concentrações das mesmas (BINDER; MAURER; LASS-FLORL, 2016).

Visando o melhor entendimento de importantes fatores que estão envolvidos ao potencial de causar doença apresentado por bactérias do Bcc, o modelo alternativo utilizando a traça grande da cera, *G. mellonella* foi utilizado para teste de infecção por bactérias do complexo (SEED; DENNIS, 2008). O modelo já foi utilizado em estudos sobre bactérias patogênicas de humanos, incluindo *P. aeruginosa* (MIYATA *et al.*, 2003), *Bacillus cereus* (FEDHILA *et al.*, 2006), *Proteus mirabilis* (MORTON *et al.*, 1987), *Francisella tularensis* (APERIS *et al.*, 2007), bem como patógenos fúngicos *Cryptococcus neoformans* (MYLONAKIS *et al.*, 2005), *Aspergillus* spp. (REEVES *et al.*, 2004), e *Candida albicans* (COTTER; DOYLE; KAVANAGH, 2000).

A Galleria mellonella é um inseto da ordem Leptidoptera, pertencente à família Pyralidae, popularmente conhecida por traça grande da cera ou a traça do favo de mel, a larva dessa espécie é uma das mais importantes pragas de colmeias de abelhas, prejudicando a produção de mel devido ao seu hábito alimentar (GUERRA, 1973). A utilização do modelo *G. mellonella* para estudos de

patogenicidaade e virulência de micro-organismos se tornou bastante popular nos últimos anos (FEDHILA *et al.*, 2010; RAMARAO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012). Os primeiros trabalhos utilizando *G. mellonella* iniciaram no final de 1950, sendo abordada a possibilidade de imunização de *G. mellonella* contra *Pseudomonas aeruginosa* (CHADWICK; VILK, 1969; STEPHENS, 1959; STEPHENS, 1963). Apenas após 2010, a utilização desse modelo de infecção começou a ser difundida e se tornou muito atraente para estudos de infecção microbiana, ultimamente, tem se utilizado também para estudar o efeito de bactérias probióticas na patogênese microbiana (KÖHLER, 2015).

O ciclo de vida de G. mellonella (Figura 1.5) tem duração de sete semanas, o tempo de desenvolvimento desde o estágio de ovo até o último estágio larval são de cinco semanas e duas semanas a partir do último estágio até a evolução à mariposa adulta. A criação dessas lagartas e manutenção em condições de laboratório, depende da disposição de mariposas (fêmeas e machos) em um recipiente com tampa e com papel para oviposição das fêmeas. Os ovos depositados nas bordas dos papéis são coletados em 2-3 dias e esses são transferidos para um recipiente de plástico com tampa perfurada para permitir a entrada de ar. Os ovos eclodem após 3 dias e as larvas são alimentadas com pólen e cera de abelha ou uma dieta artificial, que pode ser composta por mel, glicerina e uma mistura de farinhas (farinha de trigo, milho, soja, levedo de cerveja e leite em pó) (MORELO e TRENTIN, 2016). A fase larval apresenta sete instares (GUERRA, 1973), em uma criação, todo o estágio larval deve ser mantido oferecendo alimentação até o último estágio, onde iniciam a formação do casulo e suspendem a alimentação, a partir de então irão empulpar (duração de 2 semanas) e então se transformam na mariposa (estágio adulto necessário para a reprodução e continuação da criação em laboratório) (RAMARAO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012).

Figura 1.5 - Fases de desenvolvimento no ciclo de vida de *G. mellonella*. Ovos (1), larva recémreclodida há cerca de 10 dias (2), larva 20 dias após eclosão dos ovos (3), larva entre 25-35 dias após eclosão de ovos (4 e 5), último instar larval, aproximadamente 40 vias após eclosão dos ovos (6), fase pré-pupa, formação de casulo (7), pupa (8) e mariposa adulta (9)



FONTE: adaptado de Jorjão et al. (2018)

Os testes de infecção são realizados com larvas de *G. mellonella* no último estágio larval (peso variando de 200 a 300 mg e comprimento de 25 a 30 mm). A infecção bacteriana pode ser realizada por via oral, intra-hemocele ou subcutânea (Figura 1.6) (SALAMITOU *et al.*, 2000; MICHAUX, *et al.*, 2012). Entre estes métodos, a injeção oferece o benefício de a solução (do patógeno a ser testada) pode ser diretamente injetada na hemocele larval e, portanto, a quantidade de patógenos recebida pelas larvas é conhecida (JUNQUEIRA, 2012).

Figura 1.6 - Métodos de infeecção em larvas de *G. mellonella.* **(A)** Via oral (*force feeding*), uma agulha contento a solução teste (volume conhecido) é inserida na boca da larva, sem causar ferimentos, a larva deve ingerir o conteúdo-teste; **(B)** Cutânea, as larvas são imersas em solução contendo quantidade conhecida de substância a ser testada (células bacterianas ou esporos de fungos), filtra-se o conteúdo e a superfície da larva fica totalmente coberta com o conteúdo-teste; **(C)** Intra-hemocele, uma agulha é inserida em uma das prolegs e o conteúdo-teste (quantidade conhecida) é injetado diretamente na hemocele



FONTE: adaptado de Wojda et al. (2020)

A maioria dos estudos aplica procedimentos simultâneos para os estudos de infecção, larvas do grupo "controle" são compostas por indivíduos intocados, há também o grupo "controle injetadas", em que a injeção é feita, porém com tampão PBS (*phosphate buffered saline*) ou ISP (*insect physiological saline*), enquanto os grupos testados com patógenos são injetados com um volume de 10-20 µL de solução por meio de uma das *prolegs* (BINDER, MAURER; LASS-FLÖRL, 2016). O parâmetro mais utilizado para a avaliação de processos infecciosos é a taxa de mortalidade das larvas, considerando a melanização (supercífie da larva se torna escura) e ausência de movimento sob estímulo de toque como indicativos de morte da larva (MORELO; TRENTIN, 2016).

Uma correlação substancialmente positiva entre virulência e resposta do hospedeiro já foi encontrada para modelos de mamíferos comparados ao modeleo *G. mellonella* em uma gama de micro-organismos, como *Acinetobacter baumanii* (PELEG et al., 2009; GADDY et al., 2012), Francisella tularensis (APERIS et al., 2007), P. aeruginosa (JANDER; RAHME; AUSUBEL, 2000; MIYATA et al., 2003), Yersinia pseudotuberculosis (CHAMPION et al., 2009), Staphylococcus aureus (DESBOIS; COOTE, 2011), Streptococcus pyogenes (OLSEN et al., 2012), Streptococcus mutans (ABRANCHES et al., 2011), Enterococcus faecalis (YASMIN et al., 2010; MICHAUX et al., 2012), C. albicans (FUCHS et al., 2010) e C. neoformans (MYLONAKIS et al., 2005).

A utilização de modelos animais para o estudo de infecções por bactérias do Bcc fornece informações valiosas (CASH *et al.*, 1979), visto que modelos incipientes de infecção alternativos podem fornecer dados comparáveis, com menor custo, menos laboriosa e eticamente mais aceitável. Modelos alternativos já utilizados para organismos do Bcc, incluem mudas de alfafa (BERNIER *et al.*, 2003), *Caenorhabditis elegans* (KÖTHE *et al.*, 2003; HUBER *et al.*, 2004; MARKEY *et al.*, 2006) e espécies de Acanthamoeba (MAROLDA *et al.*, 1999; LAMOTHE, THYSSEN; VALVANO, 2004). Dentre esses modelos alternativos, existe pelo menos uma deficiência em relação à reprodução da virulência de Bcc observada em modelo animal (camundongos e ratos), dessa forma, a utilização do modelo *G. mellonella* para escrever a virulência de bactérias do Bcc é mais quantitativa, mais precisa e mais robusta do que outros modelos alternativos de infecção disponíveis (SEED; DENNIS, 2008).

Apesar da dificuldade de se obter e manter larvas de *G. mellonella* em comparação aos modelos de *C. elegans* e *D. melanogaster,* larvas de *G. mellonella* permitem a realização de experimentos a 37°C, mimetizando a temperatura do corpo humano, uma vantagem de grande interesse sobre os outros modelos de infecção de invertebrados. Além disso, a aquisição de dados nesse modelo é mais rápida, geralmente com resultados em uma ou duas semanas (MORELO; TRENTIN, 2016).

Além disso, o estágio larval de *G. mellonella*, utilizado no experimento de infecção, é longo permitindo uma melhor manipulação por possuir maior volume de hemolinfa, quantificar a concentração injeta (patógeno ou substância química) (MORELO; TRENTIN, 2016). Com relação aos outros modelos invertebrados, o de *G. mellonella* apresenta algumas desvantagens, como o não sequenciamento do genoma completo, a falta de caracterização do sistema imune e principalmente a

falta de linhagens padronizadas de *G. mellonella* para serem adquiridas pela comunidade científica (TSAI; LOH; PROFT, 2016).

O sistema imunológico inato de *G. mellonella* apresenta um alto grau de similaridade estrutural e funcional ao sistema imunológico inato de mamíferos (HOFFMANN, 1995), composta por uma poderosa resistência a infecções microbianas (VILMOS; KURUCZ, 1998). Essa defesa contra micro-organismos envolve as defesas celulares e humorais. A primeira linha de defesa de *G. mellonella* é a cutícula que forma uma barreira física composta por quitina (KAVANAGH; REEVES, 2004). A resposta imunológica humoral dos insetos consiste nos processos de melanização, coagulação da hemolinfa, e a produção de um número de potentes peptídeos antimicrobianos. Enquanto as reações celulares incluem fagocitose, nodulização e encapsulamento em grande escala (HOFFMANN, 1995).

As limitações no uso do modelo *G. mellonella* envolvem também a padronização de protocolos de infecção bem como de manutenção das larvas, mesmo assim, mostra-se promissor para fins de avaliação de virulência de microorganismos e da eficácia de antibacterianos em diversas infecções causadas por bactérias gram-positivas patogênica (MORELO; TRENTIN, 2016). A manutenção de larvas sem alimento nos dias que precedem a inoculação do patógeno é um fator que aumenta a susceptibilidade de *G. mellonella* à infecção (BANVILLE; BROWNE; KAVANAGH, 2012).

Assim como o tempo de pré-incubação das larvas influencia a suscetibilidade de *G. mellonella* aos patógenos *S. aureus* e *C. albicans* (BROWNE *et al.*, 2015). A privação de alimentação leva a uma redução de respostas celulares e imunológicas de *G. mellonella*, além de um aumento da susceptibilidade à infecção (BANVILLE; BROWNE; KAVANAGH, 2012), indicando a necessidade de especificação do fornecimento ou não de alimentação para as larvas utilizadas nos experimentos de infecção, permitindo que as comparações sejam válidas entre resultados obtidos em diferentes experimentos (JUNQUEIRA, 2012).

Trata-se de um modelo incipiente e promissor para diversas infecções bacterianas, porém, para ser amplamente aceito como modelo de infecção é necessário que o sequenciamento de seu genoma seja realizado, bem como a caracterização detalhada de seu sistema imune e padronização de linhagens de *G*. *mellonella* experimentais (DESBOIS; MCMILLAN, 2015). A padronização das condições de manutenção da criação de larvas em laboratórios que realizam testes de infecção com *G. mellonella* também é de fundamental importância para que as comparações de resultados entre estudos oriundos de diferentes laboratórios possam ser feitas precisamente, bem como a reprodução de experimentos quando necessária (COOK; MCARTHUR, 2013).

A comparação de estudos de infecção bacteriana mostra-se dificultada pela grande variabilidade da qualidade de larvas obtidas pelas diferentes distribuidoras ou criações próprias dos laboratórios que realizam os testes, sendo necessária a inclusão de um número maior de controles. Além disso, não há uma definição de linhagens experimentais de *G. mellonella* ideais e protocolos padronizados, incluindo métodos de reprodução e manutenção das larvas, o volume de infecção, diluição, tampão a ser utilizado e concentração de inóculo (BINDER; MAURER; LASS-FLORL, 2016).

Apesar das vantagens sobre os demais modelos invertebrados citados, o modelo *G. mellonella* não pode substituir o modelo de animais completamente. A utilização deste modelo deve servir como uma informação adicional, simples de usar, com baixo custo, curta duração de vida útil e rápida triagem que permitirá expandir a forma como o conhecimento a cerca dos fatores de virulência pode ser obtida. Por fim, não existem restrições éticas ao uso de invertebrados, tornando bastante viável a sua utilização para experimentação in vivo (SINGKUM *et al.*, 2019).

REFERÊNCIAS

ABRANCHES, J. *et al.* The collagen-binding protein Cnm is required for Streptococcus mutans adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. **Infection and immunity**, v. 79, n. 6, p. 2277-2284, 2011.

AIZAWA, T. *et al. Burkholderia bannensis* sp. nov., an acidneutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) growing in highly acidic swamps. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 1645-1650, 2011.

ALAVI, P. *et al.* Stenotrophomonas comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2014.

ALZARI, P. M. *et al.* Implementation of semi-automated cloning and prokaryotic expression screening: the impact of SPINE. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 62, n. 10, p. 1103-1113, 2006.

ANDREOLLI, M. *et al. Burkholderia fungorum* DBT1: A promising bacterial strain for bioremediation of PAHs-contaminated soils. **FEMS Microbiology Letters**, v. 319, n. 1, p. 11-18, 2011.

ANGUS, A. A. *et al.* Plant-associated symbiotic Burkholderia species lack hallmark strategies required in mammalian pathogenesis. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e83779, 2014.

APERIS, G. *et al.* Galleria mellonella as a model host to study infection by the Francisella tularensis live vaccine strain. **Microbes and infection**, v. 9, n. 6, p. 729-734, 2007.

ARAÚJO, F. D. S. *et al.* Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging reveals chemical defense of Burkholderia seminalis against cacao pathogens. **RSC advances**, v. 7, n. 48, p. 29953-29958, 2017.

ARAÚJO, F. D. S.; ARAÚJO, W. L.; EBERLIN, M. N. Potential of *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 as Biocontrol Agent Against *Fusarium oxysporum* Evaluated by Mass Spectrometry Imaging. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, 2017.

BACH, E. *et al.* Detection of misidentifications of species from the Burkholderia cepacia complex and description of a new member, the soil bacterium Burkholderia catarinensis sp. nov. **Pathogens and disease**, v. 75, n. 6, p. ftx076, 2017.

BAE, T.; SCHNEEWIND, O. Allelic replacement in Staphylococcus aureus with inducible counter-selection. **Plasmid**, v. 55, n. 1, p. 58-63, 2006.

BALWIN, A. *et al.* Environmental Burkholderia cepacia complex isolates in humans infections. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 3, p. 458-461, 2007.

BANIK, A.; MUKHOPADHAYA, S.K.; DANGAR, T.K. Characterization of N 2-fixing plant growth promoting endophytic and epiphytic bacterial community of Indian cultivated and wild rice (Oryza spp.) genotypes. **Planta**, v. 243, n. 3, p. 799-812, 2016.

BANVILLE, N.; BROWNE, N.; KAVANAGH, K.. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of Galleria mellonella larvae to infection. **Virulence**, v. 3, n. 6, p. 497-503, 2012.

BASKARA, G. *et al.* Isolation and Solubilisation of Inorganic Phosphate by Burkholderia spp. from the Rhizosphere of Oil Palm. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 23, n. 5, p. 667-673, 2020.

BERG, G.; MARTINEZ, J. L. Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the Stenotrophomonas maltophilia complex?. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 241, 2015.

BERNHARDS, R. C. *et al.* Characterization of in vitro phenotypes of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* strains potentially associated with persistent infection in mice. **Archives of Microbiology**, p. 1-25, 2016.

BERNIER, S.P. *et al.* Comparative analysis of plant and animal models for characterization of *Burkholderia cepacia* virulence. **Infection and immunity**, v. 71, n. 9, p. 5306-5313, 2003.

BERROW, N. S. *et al.* A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 6, p. e45, 2007.

BEUKES, C.W. *et al.* Genome data provides high support for generic boundaries in Burkholderia sensu lato. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1154, 2017.

BEVIVINO, A. *et al.* Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 225-231, 2000.

BHAKAT, K.; CHAKRABORTY, A.; ISLAM, E. Characterization of zinc solubilization potential of arsenic tolerant Burkholderia spp. isolated from rice rhizospheric soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 1-13, 2021.

BIBIKOVA, M. *et al.* Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. **Science**, v. 300, n. 5620, p. 764-764, 2003.

BIBIKOVA, M. *et al.* Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. **Genetics**, v. 161, n. 3, p. 1169-1175, 2002.

BINDER, U.; MAURER, E.; LASS-FLÖRL, C. Galleria mellonella: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. **Fungal biology**, v. 120, n. 2, p. 288-295, 2016.

BOCHKAREVA, O.O. *et al.* Genome rearrangements and selection in multichromosome bacteria Burkholderia spp. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 1-17, 2018.

BONGRAND, C.; RUBY, E. G. Achieving a multi-strain symbiosis: strain behavior and infection dynamics. **The ISME journal**, v. 13, n. 3, p. 698-706, 2019.

BONTEMPS, C. *et al.* Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. **Molecular ecology**, v. 19, n. 1, p. 44-52, 2010.

BOUCIAS, D.G. *et al.* Detection and characterization of bacterial symbionts in the Heteropteran, Blissus insularis. **FEMS microbiology ecology**, v. 82, n. 3, p. 629-641, 2012.

BRADER, G. *et al.* Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plantnonpathogenic endophytes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, p. 61-83, 2017.

BRAGA, R. M.; DOURADO, M. N.; ARAÚJO, W. L. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 1-13, 2016.

BRONSTEIN, J. L. Conditional outcomes in mutualistic interactions. **Trends in** ecology & evolution, v. 9, n. 6, p. 214-217, 1994.

BROWNE, N. *et al.* Prolonged pre-incubation increases the susceptibility of Galleria mellonella larvae to bacterial and fungal infection. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 458-465, 2015.

BUADES, C.; MOYA, A. Phylogenetic analysis of the isopenicillin-N-synthetase horizontal gene transfer. **Journal of Molecular Evolution**, v. 42, n. 5, p. 537-542, 1996.

BULGARI, D. *et al.* Endophytic bacterial community of grapevine leaves influenced by sampling date and phytoplasma infection process. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1-11, 2014.

BURKHEAD, K. D.; SCHISLER, D. A.; SLININGER, P. J. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 2031-2039, 1994.

BURKHOLDER, W.H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, v. 40, p. 115-117, 1950.

CAIN, C. C. *et al.* Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 4139-4141, 2000.

CANI, P. D. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. **Gut**, v. 67, n. 9, p. 1716-1725, 2018.

CAO, Y. *et al.* Antagonism of two plant-growth promoting Bacillus velezensis isolates against Ralstonia solanacearum and Fusarium oxysporum. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2018.

CARLIER, A. *et al.* The genome analysis of C andidatus B urkholderia crenata reveals that secondary metabolism may be a key function of the A rdisia crenata leaf nodule symbiosis. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2507-2522, 2016.

CARLIER, A. L.; EBERL, L. The eroded genome of a Psychotria leaf symbiont: hypotheses about lifestyle and interactions with its plant host. **Environmental microbiology**, v. 14, n. 10, p. 2757-2769, 2012.

CARRELL, A. A.; FRANK, C. Bacterial endophyte communities in the foliage of coast redwood and giant sequoia. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1008, 2015.

CASH, H. A. *et al.* A rat model of chronic respiratory infection with Pseudomonas aeruginosa. **American Review of Respiratory Disease**, v. 119, n. 3, p. 453-459, 1979.

CHADWICK, J. S.; VILK, E. Endotoxins from several bacterial species as immunizing agents against Pseudomonas aeruginosa in Galleria mellonella. **Journal of invertebrate pathology**, v. 13, n. 3, p. 410-415, 1969.

CHAIN, P. S. G. *et al.* Burkholderia xenovorans LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 42, p. 15280-15287, 2006.

CHAPMAN, J. R.; TAYLOR, M. R.G.; BOULTON, S. J. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. **Molecular cell**, v. 47, n. 4, p. 497-510, 2012.

CHATTERJEE, D. *et al.* Structure and biophysical characterization of the Sadenosylmethionine-dependent O-methyltransferase PaMTH1, a putative enzyme accumulating during senescence of Podospora anserina. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 26, p. 16415-16430, 2015.

CHEN, W. M. *et al. b*-rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. **New Phytologist**, v. 168, n. 3, p. 661-675, 2005a.

CHEN, W. M. *et al. Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1055-1059, 2007.

CHEN, W. M. *et al.* Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: A study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7461-7471, 2005b.

CHEWAPREECHA, C. *et al.* Global and regional dissemination and evolution of Burkholderia pseudomallei. **Nature microbiology**, v. 2, n. 4, p. 1-8, 2017.

CHIARINI, L. *et al.* Burkholderia cepacia complex species: health hazards and biotechnological potential. **Trends in microbiology**, v. 14, n. 6, p. 277-286, 2006.

CHOI, K. H.; SCHWEIZER, H. P. An improved method for rapid generation of unmarked Pseudomonas aeruginosa deletion mutants. **BMC microbiology**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2005.

CHOUDHARY, K. S. *et al.* The organization of the quorum sensing luxI/R family genes in Burkholderia. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 7, p. 13727-13747, 2013.

CHRISTEN, B. *et al.* The essential genome of a bacterium. **Molecular systems biology**, v. 7, n. 1, p. 528, 2011.

CHRISTIAN, M. *et al.* Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. **Genetics**, v. 186, n. 2, p. 757-761, 2010.

COENYE, T. *et al.* Burkholderia ambifaria sp. nov., a novel member of the Burkholderia cepacia complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1481-1490, 2001a.

COENYE, T. *et al.* Burkholderia cepacia genomovar VI, a new member of the Burkholderia cepacia complex isolated from cystic fibrosis patients. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 2, p. 271-279, 2001b.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. **Environmental microbiology**, v. 5, n. 9, p. 719-729, 2003.

COMPANT, S. *et al.* Diversity and occurrence of Burkholderia spp. in the natural environment. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 4, p. 607-626, 2008.

COMPANT, S. *et al.* Endophytic colonization of Vitis vinifera L. by plant growthpromoting bacterium Burkholderia sp. strain PsJN. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1685-1693, 2005.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization**. Soil Biology and Biochemistry**, v.42, n.5, p. 669-678, 2010.

CONG, L. *et al*. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 819-823, 2013.

COOK, S. M.; MCARTHUR, J. D. Developing Galleria mellonella as a model host for human pathogens. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 350-353, 2013.
COTTER, G.; DOYLE, S.; KAVANAGH, K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 163-169, 2000.

COUTINHO, C. P. *et al.* Long-term colonization of the cystic fibrosis lung by Burkholderia cepacia complex bacteria: epidemiology, clonal variation, and genome-wide expression alterations. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 1, p. 12, 2011.

CUCCUI, J. *et al.* Development of signature-tagged mutagenesis in Burkholderia pseudomallei to identify genes important in survival and pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 75, n. 3, p. 1186-1195, 2007.

DA SILVA, D. A. F. *et al.* Endophytic microbial community in two transgenic maize genotypes and in their near-isogenic non-transgenic maize genotype. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014.

DARSANDHARI, S. *et al.* Characterization of regioselective flavonoid Omethyltransferase from the Streptomyces sp. KCTC 0041BP. **Enzyme and microbial technology**, v. 113, p. 29-36, 2018.

DAVIDSON, R. C. *et al.* A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. **Microbiology**, v. 148, n. 8, p. 2607-2615, 2002.

DE COSTA, D. M.; ERABADUPITIYA, H. R. U. T. An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. **Postharvest Biology and Technology**, v. 36, n. 1, p. 31-39, 2005.

DE SMET, B. *et al.* Burkholderia stagnalis sp. nov. and Burkholderia territorii sp. nov., two novel Burkholderia cepacia complex species from environmental and human sources. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2265-2271, 2015.

DENG, P. *et al.* Comparative genome-wide analysis reveals that Burkholderia contaminans MS 14 possesses multiple antimicrobial biosynthesis genes but not major genetic loci required for pathogenesis. **Microbiologyopen**, v. 5, n. 3, p. 353-369, 2016.

DEPOORTER, E. *et al.* Burkholderia: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5215-5229, 2016.

DESBOIS, A. P.; COOTE, P. J. Wax moth larva (Galleria mellonella): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. 1785-1790, 2011.

DESBOIS, A. P.; MCMILLAN, S. Paving the way to acceptance of Galleria mellonella as a new model insect. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 410-411, 2015.

DEVI, U. *et al.* Genomic and Functional Characterization of a Novel *Burkholderia* sp. Strain AU4i from Pea Rhizosphere Conferring Plant Growth Promoting Activities. **Advancements in Genetic Engineering**, v. 4, n. 3, 2015.

DOBRITSA, A. P.; SAMADPOUR, M. Transfer of eleven species of the genus Burkholderia to the genus Paraburkholderia and proposal of Caballeronia gen. nov. to accommodate twelve species of the genera Burkholderia and Paraburkholderia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 2836-2846, 2016.

DOSE, B. *et al.* Unexpected bacterial origin of the antibiotic icosalide: two-tailed depsipeptide assembly in multifarious Burkholderia symbionts. **ACS chemical biology**, v. 13, n. 9, p. 2414-2420, 2018.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, 2014.

DREVINEK, P. *et al.* Gene expression changes linked to antimicrobial resistance, oxidative stress, iron depletion and retained motility are observed when Burkholderia cenocepacia grows in cystic fibrosis sputum. **BMC infectious diseases**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2008.

EBERL, L. Quorum sensing in the genus Burkholderia. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, n. 2-3, p. 103-110, 2006.

EBERL, L.; VANDAMME, P. Members of the genus Burkholderia: good and bad guys. **F1000Research**, v. 5, 2016.

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, v. 46, n. 4, p. 387-400, 2001.

EL CHAKHTOURA, N. G. *et al.* A 17-year nationwide study of *Burkholderia cepacia* complex bloodstream infections among patients in the United States Veterans Health Administration. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 65, n. 8, p. 1327, 2017.

EL-KIRAT-CHATEL, S.; DEMENTHON, K.; NOËL, T. A two-step cloning-free PCRbased method for the deletion of genes in the opportunistic pathogenic yeast Candida lusitaniae. **Yeast**, v. 28, n. 4, p. 321-330, 2011.

ELLIOTT, G. N. *et al.* <u>Burkholderia</u> spp. are the most competitive symbionts of Mimosa, particularly under N-limited conditions. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 4, p. 762-778, 2009.

ELSCHNER, M. C. *et al.* Isolation of the highly pathogenic and zoonotic agent *Burkholderia pseudomallei* from a pet green Iguana in Prague, Czech Republic. **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 283, 2014.

ELSHAFIE, H. S. et al. In vitro antifungal activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* against some *Phytopathogenic fungi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 16291-16302, 2012.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *et al.* To split or not to split: an opinion on dividing the genus Burkholderia. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1303-1314, 2016.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *et al.* Whole genome analyses suggests that Burkholderia sensu lato contains two additional novel genera (Mycetohabitans gen. nov., and Trinickia gen. nov.): implications for the evolution of diazotrophy and nodulation in the Burkholderiaceae. **Genes**, v. 9, n. 8, p. 389, 2018.

FANG, Y. et al. Diversity analysis of *Burkholderia cepacia* complex in the water bodies of West Lake, Hangzhou, China. **Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 309-314, 2011.

FANG, Y. *et al.* Diversity analysis of Burkholderia cepacia complex in the water bodies of West Lake, Hangzhou, China. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 309-314, 2011.

FEDHILA, S. *et al.* Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model Galleria mellonella. **Journal of invertebrate pathology**, v. 103, n. 1, p. 24-29, 2010.

FEDHILA, S. *et al.* Identification of Bacillus cereus internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects. **Molecular microbiology**, v. 62, n. 2, p. 339-355, 2006.

FLÓREZ, L. V. *et al.* An antifungal polyketide associated with horizontally acquired genes supports symbiont-mediated defense in Lagria villosa beetles. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2018.

FLÓREZ, L. V. *et al.* An antifungal polyketide associated with horizontally acquired genes supports symbiont-mediated defense in Lagria villosa beetles. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2018.

FLÓREZ, L. V. *et al.* Antibiotic-producing symbionts dynamically transition between plant pathogenicity and insect-defensive mutualism. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2017b.

FLÓREZ, L. V. *et al.*; KALTENPOTH, Martin. Symbiont dynamics and strain diversity in the defensive mutualism between Lagria beetles and Burkholderia. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 9, p. 3674-3688, 2017.

FLÓREZ, L. V.; KALTENPOTH, M. Symbiont dynamics and strain diversity in the defensive mutualism between Lagria beetles and Burkholderia. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 9, p. 3674-3688, 2017a.

FLUTRE, T. *et al.* Considering transposable element diversification in de novo annotation approaches. **PloS one**, v. 6, n. 1, p. e16526, 2011.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSHUK JR, P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 166-170, 1992.

FUCHS, B. B. *et al.* Role of filamentation in Galleria mellonella killing by Candida albicans. **Microbes and infection**, v. 12, n. 6, p. 488-496, 2010.

FURLAN, J. P. R. *et al.* Evaluation of different molecular and phenotypic methods for identification of environmental Burkholderia cepacia complex. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 39, 2019.

GADDY, J. A. *et al.* Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of Acinetobacter baumannii strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, Galleria mellonella caterpillars, and mice. **Infection and immunity**, v. 80, n. 3, p. 1015-1024, 2012.

GARCIA, J. R. *et al.* Partner associations across sympatric broad-headed bug species and their environmentally acquired bacterial symbionts. **Molecular ecology**, v. 23, n. 6, p. 1333-1347, 2014.

GIBSON, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature methods**, v. 6, n. 5, p. 343-345, 2009.

GONÇALVES, P. J. R. O. *et al.* Environmental interactions are regulated by temperature in Burkholderia seminalis TC3. 4.2 R3. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

GONZALEZ, C. F.; VENTURI, V.; ENGLEDOW, A. S. The phytopathogenic Burkholderia. **Burkholderia: Molecular Microbiology and Genomics**, v. 1, p. 153-176, 2007.

GONZÁLEZ-TEUBER, M.; KALTENPOTH, M.; BOLAND, W. Mutualistic ants as an indirect defence against leaf pathogens. **New Phytologist**, v. 202, n. 2, p. 640-650, 2014.

GREENBERG, D. E. *et al.* Recurrent Burkholderia infection in patients with chronic granulomatous disease: 11-year experience at a large referral center. **Clinical infectious diseases**, v. 48, n. 11, p. 1577-1579, 2009.

GROENHAGEN, U. *et al.* Production of bioactive volatiles by different Burkholderia ambifaria strains. **Journal of chemical ecology**, v. 39, n. 7, p. 892-906, 2013.

GUALDI, S.; EBERL, L. Identification of genes required for gold and silver tolerance in Burkholderia cenocepacia H111 by transposon sequencing. **Environmental Microbiology**, 2021. GUERRA, M. de S. **Bionomia das traças da cera Galeria mellonella I. e Achroia** grisella f.(Lepidoptera-galleriidae) no Municipio de Piracicaba, São Paulo. 1973.

GYANESHWAR, P. *et al.* Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 24, n. 11, p. 1276-1288, 2011.

HALL, C. M. *et al.* Diverse Burkholderia species isolated from soils in the southern United States with no evidence of B. pseudomallei. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0143254, 2015.

HAMILTON, C. M. *et al.* New method for generating deletions and gene replacements in Escherichia coli. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 9, p. 4617-4622, 1989.

HANUSZKIEWICZ, A. *et al.* Identification of the flagellin glycosylation system in Burkholderia cenocepacia and the contribution of glycosylated flagellin to evasion of human innate immune responses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 27, p. 19231-19244, 2014.

HEUNGENS, K.; PARKE, J. L. Postinfection biological control of oomycete pathogens of pea by *Burkholderia cepacia* AMMDR1. **Phytopathology**, v. 91, n. 4, p. 383-91, 2001.

HIRAMATSU, K. *et al.* The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 10, p. 486-493, 2001.

HOFFMANN, J. A. Innate immunity of insects. **Current opinion in immunology**, v. 7, n. 1, p. 4-10, 1995.

HOLDEN, M. T. G. *et al.* The genome of Burkholderia cenocepacia J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 1, p. 261-277, 2009.

HORTON, R. M. *et al.* Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. **Biotechniques**, v. 54, n. 3, p. 129-133, 2013.

HUANG, K. H. *et al.* Optimization of exopolysaccharide production and diesel oil emulsifying properties in root nodulating bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1367-1373, 2012.

HUBER, B. *et al.* The cep quorum-sensing system of Burkholderia cepacia H111 controls biofilm formation and swarming motility. **Microbiology**, v. 147, n. 9, p. 2517-2528, 2001.

HWANG, J.; CHILTON, W. S.; BENSON, D. M. Pyrrolnitrin production by *Burkholderia cepacia* and biocontrol of *Rhizoctonia* stem rot of poinsettia. **Biological Control**, v. 25, n. 1, p. 56-63, 2002.

ISHIKAWA, M. *et al.* Different endosymbiotic interactions in two hydra species reflect the evolutionary history of endosymbiosis. **Genome biology and evolution**, v. 8, n. 7, p. 2155-2163, 2016.

ITOH, H. *et al.* Evidence of environmental and vertical transmission of *Burkholderia* symbionts in the oriental chinch bug, *Cavelerius saccharivorus* (Heteroptera: Blissidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 19, p. 5974-5983, 2014.

JANDER, G.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Positive correlation between virulence of Pseudomonas aeruginosa mutants in mice and insects. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 13, p. 3843-3845, 2000.

JIANG, W. Y. *et al.* RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 233-239, 2013.

JIN, Y. *et al.* Genome-based classification of Burkholderia cepacia complex provides new insight into its taxonomic status. **Biology direct**, v. 15, n. 1, p. 1-14, 2020.

JINEK, M. *et al*. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **science**, v. 337, n. 6096, p. 816-821, 2012.

JORJÃO, A. L. *et al.* From moths to caterpillars: Ideal conditions for Galleria mellonella rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 383-389, 2018.

JUNQUEIRA, J. C. Galleria mellonella as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. 2012.

KALTENPOTH, M.; FLÓREZ, L. V. Versatile and dynamic symbioses between insects and Burkholderia bacteria. **Annual review of entomology**, v. 65, p. 145-170, 2020.

KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 101-112, 2004.

KHOSRAVI, Y. *et al.* Antimicrobial susceptibility and genetic characterisation of *Burkholderia pseudomallei* isolated from Malaysian patients. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

KIKUCHI, Y.; HOSOKAWA, T.; FUKATSU, T. An ancient but promiscuous hostsymbiont association between Burkholderia gut symbionts and their heteropteran hosts. **The ISME journal**, v. 5, n. 3, p. 446-460, 2011.

KIKUCHI, Y.; HOSOKAWA, T.; FUKATSU, T. Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 13, p. 4308-4316, 2007.

KIKUCHI, Y.; MENG, X. Y.; FUKATSU, T. Gut symbiotic bacteria of the genus Burkholderia in the broad-headed bugs Riptortus clavatus and Leptocorisa chinensis (Heteroptera: Alydidae). **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 7, p. 4035-4043, 2005.

KILANI-FEKI, O. *et al.* Environmental Burkholderia cepacia strain Cs5 acting by two analogous alkyl-quinolones and a didecyl-phthalate against a broad spectrum of phytopathogens fungi. **Current microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1490-1495, 2011.

KIM, Y. G.; CHA, J. Y.; CHANDRASEGARAN, S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 3, p. 1156-1160, 1996.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 845, 2019.

KOHLER, G. Probiotics research in Galleria mellonella. **Virulence**, v. 6, n. 1, p. 3-5, 2015.

KÖTHE, M. *et al.* Killing of Caenorhabditis elegans by Burkholderia cepacia is controlled by the cep quorum-sensing system. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 5, p. 343-351, 2003.

KUMAR, V. *et al.* Recent developments in systems biology and metabolic engineering of plant-microbe interactions. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1421, 2016.

LAMOTHE, J.; THYSSEN, S.; VALVANO, M. A. Burkholderia cepacia complex isolates survive intracellularly without replication within acidic vacuoles of Acanthamoeba polyphaga. **Cellular microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1127-1138, 2004.

LANDA, A. S. *et al.* Cometabolic degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 in a chemostat with toluene as the primary substrate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 3368-3374, 1994.

LEE, J. *et al.* Differential regulation of toxoflavin production and its role in the enhanced virulence of Burkholderia gladioli. **Molecular plant pathology**, v. 17, n. 1, p. 65-76, 2016.

LEWENZA, S.; SOKOL, P. A. Regulation of Ornibactin Biosynthesis and N-Acyl-L-Homoserine Lactone Production by CepR in Burkholderia cepacia. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 7, p. 2212-2218, 2001.

LI, B. *et al.* Molecular characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates causing bacterial fruit rot of apricot. **Plant Pathology Journal**, v. 26, n. 3, p. 223-230, 2010.

LI, B. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of rhizobacterium *Burkholderia* sp. strain R456 antagonistic to *Rhizoctonia solani*, sheath blight of rice.

World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 27, n. 10, p. 2305-2313, 2011

LIANG, D. M.; QIAO, J. J. Phylogenetic analysis of antibiotic glycosyltransferases. **Journal of molecular evolution**, v. 64, n. 3, p. 342-353, 2007.

LIM, J. H.; BAEK, S. H.; LEE, S. T. *Burkholderia sediminicola* sp. nov., isolated from freshwater sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 565-569, 2008.

LIN, S. J.; SCHRANZ, J.; TEUTSCH, S. M. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 3, p. 358-366, 2001.

LIPUMA, J. J. *et al.* An epidemic Burkholderia cepacia complex strain identified in soil. **The Lancet**, v. 359, n. 9322, 2002.

LIPUMA, J. J. *et al.* Disproportionate distribution of Burkholderia cepacia complex species and transmissibility markers in cystic fibrosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 164, n. 1, p. 92-96, 2001.

LIPUMA, J. J. Update on the Burkholderia cepacia complex. **Current opinion in pulmonary medicine**, v. 11, n. 6, p. 528-533, 2005.

LIU, C. *et al.* A fine-scale dissection of the DNA double-strand break repair machinery and its implications for breast cancer therapy. **Nucleic acids research**, v. 42, n. 10, p. 6106-6127, 2014.

LOPES, M. S. G. *et al.* Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simultaneous remotion of organic inhibitors from sugarcane bagasse hydrolysate by *Burkholderia* sp. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 9, p. 1353-1363, 2014.

LOPES-SANTOS, L. *et al.* Reassessment of the taxonomic position of Burkholderia andropogonis and description of Robbsia andropogonis gen. nov., comb. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 6, p. 727-736, 2017.

LOU, M. M. *et al.* Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen Burkholderia seminalis. **Carbohydrate research**, v. 346, n. 11, p. 1294-1301, 2011.

LOVERIDGE, E. J. *et al.* Reclassification of the specialized metabolite producer Pseudomonas mesoacidophila ATCC 31433 as a member of the Burkholderia cepacia complex. **Journal of bacteriology**, v. 199, n. 13, 2017.

LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <u>http://www.bacterio.net/-allnamesac.html</u>. Acesso em: 28 de maio de 2021.

LUVIZOTTO, D. M. *et al.* Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1829-1836, 3 mar. 2010.

MAHENTHIRALINGAM, E. *et al.* Enacyloxins are products of an unusual hybrid modular polyketide synthase encoded by a cryptic *Burkholderia ambifaria* genomic island. **Chemistry and Biology**, v. 18, n. 5, p. 665-677, 2011.

MAHENTHIRALINGAM, E. *et al.* Multilocus sequence typing breathes life into a microbial metagenome. **PLoS One**, v. 1, n. 1, p. e17, 2006.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G. Burkholderia cepacia complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1539-1551, 2008.

MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, Teresa A.; GOLDBERG, Joanna B. The multifarious, multireplicon Burkholderia cepacia complex. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 144, 2005.

MALI, P.; ESVELT, K. M.; CHURCH, G. M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. **Nature methods**, v. 10, n. 10, p. 957-963, 2013.

MANO, E. T. **Identificação de genes de** *Burkholderia* **sp. associados ao controle biológico de** *Pectobacterium carotovora***. 2011. 105f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, USP, 2011.**

MANO, E. T. **Prospecção de genes de Burkholderia seminalis TC3. 4.2 R3 com potencial para biocontrole**. 2016. 122f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, USP, 2016.

MARKEY, K. M. *et al.* Caenorhabditis elegans killing assay as an infection model to study the role of type III secretion in Burkholderia cenocepacia. **Journal of medical microbiology**, v. 55, n. 7, p. 967-969, 2006.

MAROLDA, C. L. *et al.* Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the Burkholderia cepacia complex in free-living amoebae. **Microbiology**, v. 145, n. 7, p. 1509-1517, 1999.

MARTÍNEZ-AGUILAR, L. *et al. Burkholderia caballeronis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) with the ability to effectively nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1063-1071, 2013.

MENDES, R. *et al.* Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of Burkholderia cepacia complex isolates. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7259-7267, 2007.

MICHALIK, K. *et al.* Bacteria belonging to the genus *Burkholderia* are obligatory symbionts of the eriococcids *Acanthococcus aceris* (Signoret, 1875) and *Gossyparia spuria* (Modeer, 1778) (Insecta, Hemiptera, Coccoidea). **Arthropod Structure and Development**, v. 45, p. 265-272, 2016.

MICHAUX, C. *et al.* CspR, a cold shock RNA-binding protein involved in the long-term survival and the virulence of Enterococcus faecalis. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 24, p. 6900-6908, 2012.

MILLER, S. C. M.; LIPUMA, J. J.; PARKE, J. L. Culture-based and non-growthdependent detection of the Burkholderia cepacia complex in soil environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3750-3758, 2002.

MIMA, T.; SCHWEIZER, H. P. The BpeAB-OprB efflux pump of Burkholderia pseudomallei 1026b does not play a role in quorum sensing, virulence factor production, or extrusion of aminoglycosides but is a broad-spectrum drug efflux system. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3113-3120, 2010.

MIYATA, S. *et al.* Use of the Galleria mellonella caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 71, n. 5, p. 2404-2413, 2003.

MORELO, N.; TRENTIN, D. S. Galleria mellonella: um hospedeiro experimental alternativo para estudos de infecções por bactérias gram-positivas. **Revista Liberato**, v. 17, n. 28, p. 217-250, 2018.

MORTON, D. B.; DUNPHY, G. B.; CHADWICK, J. S. Reactions of hemocytes of immune and non-immune Galleria mellonella larvae to Proteus mirabilis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 11, n. 1, p. 47-55, 1987.

MURRAY, S. *et al.* Impact of Burkholderia infection on lung transplantation in cystic fibrosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 178, n. 4, p. 363-371, 2008.

MUTAWILA, C. *et al.* Isolation, production and in vitro effects of the major secondary metabolite produced by Trichoderma species used for the control of grapevine trunk diseases. **Plant Pathology**, v. 65, n. 1, p. 104-113, 2016.

MYLONAKIS, E. *et al.* Galleria mellonella as a model system to study Cryptococcus neoformans pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842-3850, 2005.

NAZIR, R. *et al.* Lyophyllum sp. strain Karsten alleviates pH pressure in acid soil and enhances the survival of Variovorax paradoxus HB44 and other bacteria in the mycosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2146-2152, 2010.

NAZIR, R. *et al.* Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 71, n. 2, p. 169-185, 2009.

NEVES, A. A. C. Identificação de genes de Burkholderia sp. associados a antagonismo a microrganismos fitopatogênicos. 2011. 62f Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, 2011.

NICKZAD, A.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Quorum sensing controls swarming motility of Burkholderia glumae through regulation of rhamnolipids. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128509, 2015.

OLIVIA L. *et al.* Galleria mellonella as an alternative infection model for Yersinia pseudotuberculosis. **Microbiology**, v. 155, n. 5, p. 1516-1522, 2009.

OLSEN, R.J. *et al.* Virulence of serotype M3 Group A Streptococcus strains in wax worms (Galleria mellonella larvae). **Virulence**, v. 2, n. 111, 2011.

ONG, K. S. *et al.* Burkholderia paludis sp. nov., an antibiotic-siderophore producing novel Burkholderia cepacia complex species, isolated from Malaysian tropical peat swamp soil. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2046, 2016.

ONG, K. S. *et al.* Draft Genome Sequences of Two Antimicrobial-Producing *Burkholderia* sp. Strains, MSh1 and MSh2, Isolated from Malaysian tropical peat swamp soil. **Genome Announcements**, v. 2, n. 5, p. 2-3, 2014.

OREN, A.; GARRITY, G. M. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. **International journal of systematic and** evolutionary microbiology, v. 66, n. 11, p. 4299-4305, 2016.

PAJUNEN, M. I. *et al.* Generation of transposon insertion mutant libraries for Grampositive bacteria by electroporation of phage Mu DNA transposition complexes. **Microbiology**, v. 151, n. 4, p. 1209-1218, 2005.

PALLERONI, N. J. Prokaryotic diversity and the importance of culturing. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 72, n. 1, p. 3-19, 1997.

PANDEY, P.; KANG, S. C.; MAHESHWARI, D. K. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. **Current Science**, v. 89, n. 1, p. 177-180, 2005.

PANHWAR, Q. A. *et al.* Biochemical and molecular characterization of potential phosphate-solubilizing bacteria in acid sulfate soils and their beneficial effects on rice growth. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the Burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual review of phytopathology**, v. 39, n. 1, p. 225-258, 2001.

PARKER, W. L. *et al.* Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. **The Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 37, n. 5, p. 431-440, 1984

PARTIDA-MARTINEZ, L. P. *et al.* Rhizonin, the first mycotoxin isolated from the zygomycota, is not a fungal metabolite but is produced by bacterial endosymbionts. **Applied and environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 793-797, 2007.

PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; HERTWECK, C. A gene cluster encoding rhizoxin biosynthesis in "Burkholderia rhizoxina", the bacterial endosymbiont of the fungus Rhizopus microsporus. **ChemBioChem**, v. 8, n. 1, p. 41-45, 2007.

PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; HERTWECK, C. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. **Nature**, v. 437, n. 7060, p. 884-888, 2005.

PAUNGFOO-LONHIENNE, C. *et al.* A new species of *Burkholderia* isolated from sugarcane roots promotes plant growth. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 142-154, 2014.

PEETERS, C. *et al.* Phylogenomic study of Burkholderia glathei-like organisms, proposal of 13 novel Burkholderia species and emended descriptions of Burkholderia sordidicola, Burkholderia zhejiangensis, and Burkholderia grimmiae. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 877, 2016.

PELEG, Anton Y. *et al.* Galleria mellonella as a model system to study Acinetobacter baumannii pathogenesis and therapeutics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2605-2609, 2009.

PEREIRA, T. C. Introdução à técnica de CRISPR. **Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética**, 2016.

PERIN, L. *et al.* Diazotrophic *Burkholderia* Species Associated with Field-Grown Maize and Sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3103-3110, 2006.

PETERS, J. M. *et al.* A comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1493-1506, 2016.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American journal of medicine**, v. 125, n. 1, p. S3-S13, 2012.

PIDOT, S. J. *et al.* Antibiotics from neglected bacterial sources. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 1, p. 14-22, 2014.

PINEDO, I. *et al.* Burkholderia phytofirmans PsJN induces long-term metabolic and transcriptional changes involved in Arabidopsis thaliana salt tolerance. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 466, 2015.

PINTO-CARBÓ, M. *et al.* Evidence of horizontal gene transfer between obligate leaf nodule symbionts. **The ISME journal**, v. 10, n. 9, p. 2092-2105, 2016.

PINTO-CARBÓ, M. *et al.* Leaf nodule symbiosis: function and transmission of obligate bacterial endophytes. **Current opinion in plant biology**, v. 44, p. 23-31, 2018.

QUAN, C. S. *et al.* Isolation and characterization of a novel Burkholderia cepacia with strong antifungal activity against Rhizoctonia solani. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 72, n. 6, p. 1276-1284, 2006.

RAGAN, M. A. On surrogate methods for detecting lateral gene transfer. **FEMS Microbiology letters**, v. 201, n. 2, p. 187-191, 2001.

RAGUPATHI, N. K. D.; VEERARAGHAVAN, B. Accurate identification and epidemiological characterization of Burkholderia cepacia complex: an update. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2019.

RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The insect Galleria mellonella as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 70, 2012.

RAN, F. A. *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1380-1389, 2013.

REEVES, E. P. *et al.* Correlation between gliotoxin production and virulence of Aspergillus fumigatus in Galleria mellonella. **Mycopathologia**, v. 158, n. 1, p. 73-79, 2004.

REIK, R.; SPILKER, T.; LIPUMA, J. J. Distribution of Burkholderia cepacia complex species among isolates recovered from persons with or without cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 2926-2928, 2005.

REZNIKOFF, W. S. *et al.* Tn5: a molecular window on transposition. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 266, n. 3, p. 729-734, 1999.

RHOLL, D. A. *et al.* Molecular investigations of PenA-mediated β-lactam resistance in Burkholderia pseudomallei. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 139, 2011.

ROSS, C. et al. Biosynthesis of antifungal and antibacterial polyketides by *Burkholderia gladioli* in coculture with *Rhizopus microsporus*. **Mycoses**, v. 57, n. s3, p. 48-55, 2014.

ROUWS, Luc Felicianus Marie. **Mutagênese de transposon como ferramenta em estudos fisiológicos e ecológicos da bactéria Gluconacetobacter diazotrophicus**. 2008. 161f. Tese (Doutorado em Química Biológica) - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, UFRJ, 2008.

RUDGERS, J. A.; STRAUSS, S. Y. A selection mosaic in the facultative mutualism between ants and wild cotton. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 271, n. 1556, p. 2481-2488, 2004.

RUSSELL, J. A. *et al.* Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 50, p. 21236-21241, 2009.

SAENZ, H. L.; DEHIO, C. Signature-tagged mutagenesis: technical advances in a negative selection method for virulence gene identification. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 5, p. 612-619, 2005.

SALAMITOU, S. *et al.* The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus in mice and insects. **Microbiology**, v. 146, n. 11, p. 2825-2832, 2000.

SALLES, J. F.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VEEN, J. A. Effect of agricultural management regime on *Burkholderia* community structure in soil. **Microbial Ecology**, v. 52, n. 2, p. 267-279, 2006.

SANTOS, A. V. *et al.* Ocurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, n. 2, p. 319-323, 2004.

SAVARY, S. *et al.* Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. 2012.

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus Burkholderia: proposal for division of this genus into the emended genus Burkholderia containing pathogenic organisms and a new genus Paraburkholderia gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 429, 2014.

SAWICKI, A.; WILLOWS, R. D. S-Adenosyl-L-methionine: magnesiumprotoporphyrin IX O-methyltransferase from Rhodobacter capsulatus: mechanistic insights and stimulation with phospholipids. **Biochemical Journal**, v. 406, n. 3, p. 469-478, 2007.

SAWITZKE, J. A. *et al.* Recombineering: using drug cassettes to knock out genes in vivo. **Methods in enzymology**, v. 533, p. 79-102, 2013.

SCHERER, S.; DAVIS, R. W. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 10, p. 4951-4955, 1979.

SCHERLACH, K.; GRAUPNER, K.; HERTWECK, C. Molecular bacteria-fungi interactions: effects on environment, food, and medicine. **Annual review of microbiology**, v. 67, p. 375-397, 2013.

SCHMIDBERGER, J. W. *et al.* Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of DehIVa, a dehalogenase from *Burkholderia cepacia* MBA4. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, v. 61, n.3, p. 271-273, 2005.

SCHMIDT, S. *et al.* Production of the antifungal compound pyrrolnitrin is quorum sensing-regulated in members of the Burkholderia cepacia complex. **Environmental microbiology**, v. 11, n. 6, p. 1422-1437, 2009.

SEED, K. D.; DENNIS, J. J. Development of Galleria mellonella as an alternative infection model for the Burkholderia cepacia complex. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 1267-1275, 2008.

SESSITSCH, A. *et al.* Burkholderia phytofirmans sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 1187-1192, 2005.

SHEIBANI-TEZERJI, R. *et al.* Transcriptome profiling of the endophyte Burkholderia phytofirmans PsJN indicates sensing of the plant environment and drought stress. **MBio**, v. 6, n. 5, 2015.

SINGKUM, P. *et al.* A powerful in vivo alternative model in scientific research: Galleria mellonella. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 66, n. 1, p. 31-55, 2019.

SLETTA, H. *et al.* Anti-microbial and cytotoxic 1, 6-dihydroxyphenazine-5, 10-dioxide (iodinin) produced by Streptosporangium sp. DSM 45942 isolated from the fjord sediment. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 2, p. 603-610, 2014.

SOKOL, P. A. *et al.* Role of Ornibactin Biosynthesis in the Virulence ofBurkholderia cepacia: Characterization of pvdA, the Gene Encoding I-OrnithineN 5-Oxygenase. **Infection and immunity**, v. 67, n. 9, p. 4443-4455, 1999.

SOUSA, S. A.; RAMOS, C. G.; LEITAO, J. H. Burkholderia cepacia complex: emerging multihost pathogens equipped with a wide range of virulence factors and determinants. **International journal of microbiology**, v. 2011, 2011.

SPEERT, D. P. *et al.* Epidemiology of Burkholderia cepacia complex in patients with cystic fibrosis, Canada. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 2, p. 181, 2002.

STEPHENS, J. M. Immune responses of some insects to some bacterial antigens. **Canadian journal of microbiology**, v. 5, n. 2, p. 203-228, 1959.

STEPHENS, J. M. Protective effects of several immunizing preparations that produce active immunity in Galleria mellonella (Linnaeus). **Journal of Insect Pathology**, v. 5, n. 1, p. 129-&, 1963.

STOLL, S. *et al.* Bacterial microbiota associated with ants of the genus Tetraponera. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 90, n. 3, p. 399-412, 2007.

STOPNISEK, N. *et al.* Molecular mechanisms underlying the close association between soil Burkholderia and fungi. **The ISME journal**, v. 10, n. 1, p. 253-264, 2016.

STRUCK, A. W. *et al.* S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications. **ChemBioChem**, v. 13, n. 18, p. 2642-2655, 2012.

SU, F. *et al.* Burkholderia phytofirmans PsJN reduces impact of freezing temperatures on photosynthesis in Arabidopsis thaliana. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 810, 2015.

SUÁREZ-MORENO, Z. R. *et al.* Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated Burkholderia. **Microbial ecology**, v. 63, n. 2, p. 249-266, 2012.

SUDAKARAN, S. *et al.* Evolutionary transition in symbiotic syndromes enabled diversification of phytophagous insects on an imbalanced diet. **The ISME journal**, v. 9, n. 12, p. 2587-2604, 2015.

SUDAKARAN, S.; KOST, C.; KALTENPOTH, M. Symbiont acquisition and replacement as a source of ecological innovation. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 375-390, 2017.

SUNG, C. K. *et al.* An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in Streptococcus pneumoniae. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5190-5196, 2001.

SUPPIGER, A. *et al.* Two quorum sensing systems control biofilm formation and virulence in members of the Burkholderia cepacia complex. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 400-409, 2013.

TABACCHIONI, S. *et al.* Bulkholderia cepacia complex in the rhizosphere: a minireview. **Annals of microbiology**, v. 52, n. 2, p. 103-118, 2002.

TAKESHITA, K. *et al. Burkholderia* of plant-beneficial group are symbiotically associated with bordered plant bugs (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). **Microbes and Environments**, v. 30, n. 4, p. 321-329, 2015.

TALLAPRAGADA, P.; DIKSHIT, R.; SESHAGIRI, S. Isolation and optimization of IAA producing Burkholderia seminalis and its effect on seedlings of tomato. **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, v. 37, n. 5, 2015.

TENORIO-SALGADO, S. *et al.* Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. **Bioengineered**, v. 4, n. 4, p. 236-243, 2013.

TSAI, C. J. Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016.

TSUI, S. **Estudo do cluster n-TASE nas interações ambientais de** *B.* **seminalis TC3.4.2R3**. 2021. 283f. Tese de Doutorado (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, São Paulo, USP, 2021.

TURNER, J. M.; MESSENGER, A. J. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. **Advances in microbial physiology**, v. 27, p. 211-275, 1986.

UROZ, S. *et al.* Distinct ectomycorrhizospheres share similar bacterial communities as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 8, p. 3020-3024, 2012.

VALIN, H. *et al.* The future of food demand: understanding differences in global economic models. **Agricultural Economics**, v. 45, n. 1, p. 51-67, 2014.

VAN BORM, S. *et al.* Tetraponera ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. **Proc. R. Soc. B**, v. 269, p. 2023-2027, 2002

VANDAMME, P. *et al.* Burkholderia bryophila sp. nov. and Burkholderia megapolitana sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant-growth-promoting properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2228-2235, 2007.

VANDAMME, P. *et al.* Occurrence of Multiple Genomovars of Burkholderia cepacia in Cystic Fibrosis Patients and Proposal of Burkholderia multivorans sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1188-1200, 1997.

VANDAMME, P.; DAWYNDT, P. Classification and identification of the Burkholderia cepacia complex: past, present and future. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 87-95, 2011.

VANLAERE, E. et al. Burkholderia latens sp. nov., Burkholderia diffusa sp. nov., Burkholderia arboris sp. nov., Burkholderia seminalis sp. nov., and Burkholderia metallica sp. nov., novel species within the Burkholderia cepacia complex. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 58, n. 7, p. 1580-1590, 2008.

VANLAERE, E. *et al.* Taxon K, a complex within the Burkholderia cepacia complex, comprises at least two novel species, Burkholderia contaminans sp. nov. and Burkholderia lata sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 1, p. 102-111, 2009.

VERNIKOS, G. S.; PARKHILL, J. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the Salmonella pathogenicity islands. **Bioinformatics**, v. 22, n. 18, p. 2196-2203, 2006.

VIAL, L. *et al.* Burkholderia diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 1407-1429, 2007.

VIAL, L. *et al.* The various lifestyles of the Burkholderia cepacia complex species: a tribute to adaptation. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2011.

VIDEIRA, P. A.; GARCIA, A. P.; SÁ-CORREIA, I. Functional and topological analysis of the Burkholderia cenocepacia priming glucosyltransferase BceB, involved in the biosynthesis of the cepacian exopolysaccharide. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 14, p. 5013-5018, 2005.

VILMOS, P.; KURUCZ, E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. **Immunology letters**, v. 62, n. 2, p. 59-66, 1998.

VINALE, F. *et al.* Trichoderma-plant-pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 1-10, 2008.

VOLLMER, W.; BLANOT, D.; DE PEDRO, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. 149-167, 2008.

VOS, C. M. F. *et al.* The toolbox of T richoderma spp. in the biocontrol of B otrytis cinerea disease. **Molecular plant pathology**, v. 16, n. 4, p. 400-412, 2015.

VOS, M. *et al.* Rates of lateral gene transfer in prokaryotes: high but why?. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 10, p. 598-605, 2015.

VU, H. P.; MU, A.; MOREAU, J. W. Biodegradation of thiocyanate by a novel strain of Burkholderia phytofirmans from soil contaminated by gold mine tailings. **Letters in applied microbiology**, v. 57, n. 4, p. 368-372, 2013.

WAH-TANG, P. *et al.* A review of gene knockout strategies for microbial cells. **Recent patents on biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 176-197, 2015.

WANG, Y. J. *et al.* Horizontal transfer of genetic determinants for degradation of phenol between the bacteria living in plant and its rhizosphere. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 77, n. 3, p. 733-739, 2007.

WARMINK, J. A. *et al.* Hitchhikers on the fungal highway: the helper effect for bacterial migration via fungal hyphae. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 760-765, 2011.

WARMINK, J. A.; NAZIR, R.; VAN ELSAS, J. D. Universal and species-specific bacterial 'fungiphiles' in the mycospheres of different basidiomycetous fungi. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 300-312, 2009.

WEBER, C. F.; KING, G. M. Volcanic soils as sources of novel CO-oxidizing Paraburkholderia and Burkholderia: Paraburkholderia hiiakae sp. nov., Paraburkholderia metrosideri sp. nov., Paraburkholderia paradisi sp. nov., Paraburkholderia peleae sp. nov., and Burkholderia alpina sp. nov. a member of the Burkholderia cepacia complex. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 207, 2017.

WEISSKOPF, L.; HELLER, S.; EBERL, L. Burkholderia species are major inhabitants of white lupin cluster roots. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 21, p. 7715-7720, 2011.

WOJDA, I. *et al.* The greater wax moth Galleria mellonella: biology and use in immune studies. **Pathogens and Disease**, v. 78, n. 9, p. ftaa057, 2020.

YABUUCHI, E. *et al.* Proposal of Burkholderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus Pseudomonas homology group II to the new genus, with the type species Burkholderia cepacia (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and immunology**, v. 36, n. 12, p. 1251-1275, 1992.

YANG, J. H. *et al.* Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 91-104, 2008.

YASMIN, A. *et al.* Comparative genomics and transduction potential of Enterococcus faecalis temperate bacteriophages. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 4, p. 1122-1130, 2010.

YOO, S.H. *et al. Burkholderia soli* sp. nov., isolated from soil cultivated with Korean ginseng. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 122-125, 2007.

ZENG, Y. H. *et al.* Functional type 2 photosynthetic reaction centers found in the rare bacterial phylum Gemmatimonadetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 21, p. 7795-7800, 2014.

ZHANG, M. C. *et al.* Identification of Genes Involved in Antifungal Activity of Burkholderia seminalis Against Rhizoctonia solani Using Tn5 Transposon Mutation Method. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 797, 2020.

ZHU, B. *et al.* Characterization and inference of gene gain/loss along burkholderia evolutionary history. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 7, p. EBO. S7510, 2011.

ZIRKEL, J. *et al.* Epidemiology of Candida blood stream infections in patients with hematological malignancies or solid tumors. **Medical mycology**, v. 50, n. 1, p. 50-55, 2012.

2 INFERÊNCIA DE TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DO CLUSTER *N-TASE*

Resumo

TSUI, S. **Estudo do cluster n-TASE nas interações ambientais de** *B. seminalis* **TC3.4.2R3**. 2021. 283f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A linhagem B. seminalis TC3.4.2R3 pertence ao grupo Bcc, composto por espécies patogênicas oportunistas, mas também por espécies com potencial biotenológico. A transferência horizontal gênica (HGT) exerce um papel importante em Burkholderia, atribuindo importantes funções relacionadas à inovação ecológica. Avaliou-se a história evolutiva do cluster n-TASE em TC3.4.2R3, por meio da combinação de métodos de estudo de HGT como filogenia, genômica comparativa e análise molecular. Observou-se que o n-TASE não é um cluster comum à espécie B. seminalis, por meio de detecção de PCR bem como por busca de seguências homólogas em bancos de dados. Além disso, o padrão de distribuição esporádica de n-TASE entre as espécies do gênero é consistente com a ideia de eventos independentes de HGT. O cluster n-TASE de TC3.4.2R3 apresentou maior similaridade com as sequências homólogas de Aquamicrobium sp. SK-2 e B. contaminans LMG23361. Foi possível fornecer evidências de que o n-TASE foi adquirido por meio de um evento de HGT, especula-se uma possível relação do cluster em processos relacionados a aplicações biotecnológicas como atividade antimicrobiana ou degradação de poluentes. Na etapa seguinte do presente trabalho (capítulo 3) foi realizada a inativação de genes desse cluster bem como a análise dos fenótipos resultantes, procurando entender o envolvimento do cluster n-TASE na interação dessa bactéria no meio ambiente. Não foi possível afirmar qual foi a linhagem doadora mais provável do cluster n-TASE, ressalta-se que o evento de HGT não ocorreu em todas as linhagens do grupo Bcc, e também ele não ocorreu especificamente na espécie B. seminalis, mas, pontualmente, na linhagem TC34.2R3.

Palavras-chave: cluster n-TASE; HGT; análise filogenética; *Aquamicrobium* sp. SK-2; *B. contaminans* LMG23361

Abstract

TSUI, S. **Study of the n-TASE cluster on environmental interactions of** *B. seminalis* **TC3.4.2R3.** 2021, 283f. PhD thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The B. seminalis TC3.4.2R3 strain belongs to the Bcc group, composed by opportunistic pathogenic species, but also species with biotenological potential. Horizontal gene transfer (HGT) plays an important role in *Burkholderia*, attributing important functions related to ecological innovation. The evolutionary history of the n-TASE cluster in TC3.4.2R3 was evaluated by combining HGT study methods such as phylogeny, comparative genomics and molecular analysis. It was observed that n-TASE is not a common cluster to *B. seminalis* species, through PCR detection as well as homologous sequences search in databases. Furthermore, the sporadic distribution pattern of n-TASE among species of the genus is consistent with the idea of independent HGT events. The n-TASE cluster of TC3.4.2R3 showed greater similarity with the homologous sequences of Aquamicrobium sp. SK-2 and B. contaminans LMG23361. It was possible to provide evidence that n-TASE was acquired through an HGT event, it is believed that it has a correlation in biotechnological applications related processes, such as antimicrobial activity or pollutant degradation. In the next step of this work (chapter 3), the inactivation of genes in this cluster was performed, as well as the analysis of the resulting phenotypes, trying to understand the involvement of the n-TASE cluster in the interaction of this bacterium in the environment. It was not possible to determine which was the most likely donor strain of the n-TASE cluster, the HGT event did not occur in all strains of the Bcc group, and it did not occur specifically in the species B. seminalis, but it did occurred punctually in the strain B. seminalis TC34.2R3.

Key words: n-TASE cluster; HGT; phylogenetic analysis; *Aquamicrobium* sp. SK-2; *B. contaminans* LMG23361

2.1 Introdução

O gênero Burkholderia se divide em dois clados (SUÁREZ-MORENO et al., 2012; EBERL; VANDAMME, 2016), sendo que as Burkholderia patogênicas são classificadas em (i) grupo "pseudomallei" (*B. pseudomallei, B. mallei* e *B. thailandensis*) e (ii) complexo Burkholderia cepacia (Bcc), que corresponde às espécies de patógenos oportunistas (SUÁREZ-MORENO et al., 2012). Espécies do Bcc apresentam um enorme potencial para aplicação, principalmente, biotenológica (VIAL et al., 2007).

A linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 pertence ao grupo Bcc, mas foi isolada dos tecidos internos das raízes da cana-de-açúcar (LUVIZOTTO *et al.*, 2010). É um agente eficaz no controle dos sintomas de necrose de orquídea causada por *Burkholderia gladioli* (ARAÚJO *et al.*, 2016), possui virulência em modelo *Galleria melonella* aumentada e redução de produção de compostos antifúngicos a 37°C (GONÇALVES *et al.*, 2018). Além disso, TC3.4.2R3 também produz uma série de metabólitos associados à inibição de *Fusarium oxysporum* (ARAÚJO *et al.*, 2017a) e *Moniliophthora perniciosa, Phytophthora citrophtora, P. capsici e P. palmivora* (ARAÚJO *et al.*, 2017b).

A transferência gênica lateral ou horizontal (LGT ou HGT) é a transmissão de porções do DNA genômico entre organismos por meio de um processo independente da transferência vertical (HIRAMATSU *et al.*, 2001). A importância desses eventos para a evolução dos genomas procariontes é bastante notável, trazendo consequências práticas relevantes como a rápida disseminação da resistência aos antibióticos e fatores de virulência (VOS *et al.*, 2015).

Diversos estudos mostraram o papel da HGT em *Burkholderia*, atribuindo funções relacionadas à degradação de poluentes (CHAIN *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007), sobrevivência e patogênese (HOLDEN *et al.*, 2009) e simbiose (FLÓREZ; KALTENPOTH, 2017; FLÓREZ *et al.*, 2017), exercendo um importante papel na inovação ecológica (FLÓREZ *et al.*, 2018). Em 60 genomas completos de *Burkholderia* foi observado que a HGT desempenha um papel importante na adaptação e na patogenicidade, no entanto, a maioria desses genes adquiridos codificam proteínas hipotéticas ou proteínas específicas de *Burkholderia* de função desconhecida (ZHU *et al.*, 2011).

O genoma de B. seminalis TC3.4.2R3 foi sequenciado e comparado com outras Burkholderia (ARAÚJO et al. 2016). Foi identificado um cluster de genes em um locus de 4.378 bp no cromossomo 1 que também está presente em B. contaminans (CP046609.1), mas ausente em outras espécies de Burkholderia relacionadas (incluindo B. cenocepacia e B. ambifaria). Esse cluster é composto por quatro genes que codificam uma glicosiltransferase (Bsem_02857), uma metiltransferase (Bsem_02858) e duas proteínas hipotéticas (Bsem_02859 e Bsem_02860). Na maioria das linhagens de Burkholderia, as glicosiltransferases (GTFs) estão envolvidas na síntese de vários compostos importantes para a adaptação e competição de bactérias em seu ambiente (VIDEIRA; GARCIA; SÁ-CORREIA, 2005; LIANG; QIAO, 2007; HANUSZKIEWICZ et al., 2014). Em B. seminalis TC3.4.2R3, foi encontrado um gene da glicosiltransferase associado à produção de piochelina e ramnolipídeo (ARAÚJO; ARAÚJO; EBERLIN, 2017). De modo geral, as O-Metiltransferases (OMTs) são frequentemente caracterizadas nas vias biossintéticas de metabólitos secundários, e também têm sido utilizadas para modificações biotecnológicas em diversos compostos, como flavonóides, alcalóides e antibióticos (DARSANDHARI et al., 2018). É possível que glicosiltransferases e metiltransferases estejam associadas à síntese de metabólitos secundários em Burkholderia spp, na forma de enzimas-chave.

O presente estudo visou a caracterização de um cluster gênico de 4.378 bp e avaliação de sua história evolutiva. Devido à falta de conhecimento sobre os quatro genes pertencentes a esse cluster e sua potencial função em TC3.4.2R3, ele foi denominado de cluster **n-TASE** para melhor identificação durante o estudo (**n**para **n**ão identificado e **TASE** - para **t**ransfer**ase**s). Dessa forma, o cluster n-TASE refere-se ao cluster composto pelos quatro genes Bsem_02857, Bsem_02858, Bsem_02859 e Bsem_02860. Nesta etapa do presente estudo, o foco foi a análise da origem do cluster n-TASE em *B. seminalis* TC3.4.2R3, uma linhagem de relevância agrícola e biotecnológica, para caracterizar o mecanismo evolutivo da aquisição horizontal de genes relacionados à interação bacteriana no ambiente. O fenômeno HGT em endófitos destaca um importante mecanismo biológico para sua adaptação evolutiva dentro da planta hospedeira e simultaneamente confere "novos traços" (WANG *et al.*, 2010). Metodologias convincentes para identificação de eventos de HGT em genomas bacterianos, ainda não são triviais. Normalmente, as abordagens são baseadas na análise da composição do DNA; de padrões filéticos incomuns; da topologia de árvores filogenéticas; e da presença de elementos genéticos móveis (RAGAN, 2001). Dessa forma, foram combinados métodos de estudo de HGT como filogenia, genômica comparativa (incluindo busca por similaridade, análise de conteúdo de GC, comparação estatística do íncide de adaptação de codon - CAI) e análise molecular para revelar se a origem evolutiva de do cluster n-TASE envolve um evento de HGT ou se foi resultado de outro fenômeno de adaptação genética.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Linhagens bacterianas

A linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 pertence à coleção microbiana do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana (Departamento de Microbiologia, ICB / USP) e foi isolada de tecidos internos de raiz de cana-de-açúcar (LUVIZOTTO *et al.*, 2010), enquanto as demais *B. seminalis*, LMG19587, LMG24067, LMG24271, LMG24272 e LMG24273 foram obtidas da coleção belga (Belgian Coordinated collections of micro-organisms - BCCM/LMG). A linhagem *B. cenocepacia* H111 foi gentilmente cedido pelo Professor Leo Eberl da Universidade de Zurique. Todas as cepas foram armazenadas a –80 °C em meio de cultivo Luria-Bertani (LB) e glicerol a 20%. As linhagens de *Burkholderia* spp. foram cultivadas em meio Luria-Bertani por 24 h a 28 °C.

2.2.2 Análise integrada de ilhas genômicas

O software IslandViewer (disponível em: http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/) foi usado online para a predição e visualização interativa de ilhas genômicas (GIs), consideradas regiões possivelmente provenientes de transferência gênica horizontal (BERTELLI *et al.*, 2017) em genomas de Bacteria e Archaea. O cromossomo 1 do genoma da linhagaem TC3.4.2R3 foi analisado usando as configurações padrão do software para predição integrada das regiões de GI.

Um (forward, de primers HGT_P2_RIGHT, par GAGTACATCCTGTCGTCGGAGA reverse, HGT_P1_LEFT, е ATGGGTATGGACATGTAATCGAC) foram desenhados para a detecção da seguência do cluster n-TASE nas linhagens de TC3.4.2R3, bem como em outras cinco B. seminalis (LMG19587, LMG24067, LMG24271, LMG24272 e LMG24273) e na linhagem B. cenocepacia H111. O DNA genômico de cada linhagem foi isolado usando o Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega) e a PCR foi realizada usando Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs). As reações com volume final de 25 µL foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: 98 °C por 30 s seguido por 35 ciclos de 98 °C por 10 s; 66 °C durante 30 s; e 72 ° C durante 2 min; extensão final a 72 °C por 2 min. Os produtos de PCR foram todos avaliados em gel de eletroforese a 1%.

2.2.4 Análise filogenética

Todas as sequências gênicas (16S rRNA, pirimidina quinase, chaperonina GROEL, glicosiltransferase, metiltransferase e proteínas hipotéticas) utilizadas na presente análise filogenética utilizando as linhagens bacterianas de Burkholderia [B. ambifaria AMMD (NCBI Taxon ID 339670); B. gladioli ATCC 10248 (NCBI Taxon ID 28095); B. cepacia AMMD (NCBI Taxon ID 339670); B. cenocepacia K56-2 (NCBI Taxon ID 985076); B. ambifaria RZ2MS16 (NCBI Taxon ID 152480); Burkholderia sp. AU31652 (NCBI Taxon ID 2015354); B. unamae TAtl-371 (NCBI Taxon ID 95486); B. anthina MSMB1496 (NCBI Taxon ID 179879); B. cenocepacia J2315 (NCBI Taxon ID 216591); B. cenocepacia H111 (NCBI Taxon ID 1055524) B. seminalis FL-5-4-10-S1-D7 (NCBI Taxon ID 488731); B. seminalis FL-5-5-10-S1-D0 (NCBI Taxon ID 488731); B. ubonensis MSMB761WGS (NCBI Taxon ID 101571); B. territorii MSMB2156WGS (NCBI Taxon ID 1503055); Paraburkholderia sacchari LMG19450 (NCBI Taxon ID 159450); Aquamicrobium sp. SK-2 (NCBI Taxon ID 1560338); Bukrholderia sp. AU6039 (NCBI Taxon ID 2015344); B. cenocepacia DWS 37E-2 (NCBI Taxon ID 95486); B. contaminans LMG23361 (NCBI Taxon ID 1334628); B. latens AU17928 (NCBI Taxon ID 488446); Burkholderia sp. AU31652 (NCBI Taxon ID 2015354); Burkholderia sp. HI2500 (NCBI Taxon ID 2015358); Mumia flava MUSC201 (NCBI

^{2.2.3} Detecção por PCR do cluster n-TASE em Burkholderia spp.

Taxon ID 1348852) and *B. territori* MSMB1919WGS (NCBI Taxon ID 1503055)] foram recuperadas do Banco de dados do site IMG (<u>www.img.jgi.doe.gov</u>), por meio da identificação de genes homólogos, realizando uma busca por locus tags dos genes de pirimidina quinase e chaperonina GROEL do genoma da linhagem *B. ambifaria* AMMD.

Anteriormente à análise filogenética, sequências dos genes de pirimidina quinase e chaperonina GROEL de todas as linhagens de Burkholderia (acima descritas) foram concatenadas em uma sequência de 2,5 Kb; as sequências dos seis genes (pirimidina quinase, glicosiltransferase, metiltransferase, proteínas hipotéticas e chaperonina GROEL) das Burkholderia que apresentam a região de homologia do cluster n-TASE [Aquamicrobium sp. SK-2 (NCBI Taxon ID 1560338); Bukrholderia sp. AU6039 (NCBI Taxon ID 2015344); B. cenocepacia DWS 37E-2 (NCBI Taxon ID 95486); B. contaminans LMG23361 (NCBI Taxon ID 1334628); B. latens AU17928 (NCBI Taxon ID 488446); Burkholderia sp. AU31652 (NCBI Taxon ID 2015354); Burkholderia sp. HI2500 (NCBI Taxon ID 2015358); Mumia flava MUSC201 (NCBI Taxon ID 1348852) and B. territori MSMB1919WGS (NCBI Taxon ID 1503055)] foram concatenadas em umq sequência de ~7Kb; finalmente, as sequências gênicas homólogas dos quatro genes que compõem o n-TASE cluster em TC3.4.2R3 nas linhagens de *Burkholderia* também foram concatenadas emu ma sequência de ~4,5Kb. A composição gênica também foi feita para a linhagem TC3.4.2R3 para comparações.

Cada um dos três conjuntos de composição gênica concatenados (**i**. pirimidina quinase e chaperonina GROEL de 2,5 kb; **ii**. pirimidina quinase, glicosiltransferase, metiltransferase, proteínas hipotéticas e chaperonina GROEL de 7 Kb; **iii**. glicosiltransferase, metiltransferase, proteína hipotética e proteína hipotética de 4,5 kb) foram alinhados utilizando a ferramenta ClustalW (BATADA; HURST, 2007) por meio do programa MEGA-X. O programa MEGA-X também foi utilizado para a construção de árvores filogenéticas por meio do método de Neighboor-Joining. Os números localizados próximos aos nós das árvores representam valores de bootstrap (baseado em 500 tentativas de re-amostragem). Uma análise filogenética para os genes de glicosiltransferase e metiltransferase com os genomas de TC3.4.2R3 e de linhagens de *Burkholderia* recuperadas do banco de dados do IMG (*B. seminalis* FL-5-4-10-S1-D7, *B. cepacia* AMMD, *B. cenocepacia* J2315, *B. cenocepacia* DWS 37E-2, *B. cenocepacia* H111, *B. contaminans* LMG 23361 and *Aquamicrobium* sp. SK-2) foi realizada. As transferases com anotações com funções diferentes ou classificadas em outro grupo, distinto daquele em TC3.4.2R3 foram recuperadas do banco de dados do IMG. As sequências de cada transferase foram alinhadas utilizando o ClustalW e uma árvore filogenética foi construída utilizando o método de Maximum Likelihood utilizando a correção de distância Kimura's 2-parameter.

2.2.5 Conteúdo de GC e viés de códon

O conteúdo de GC e o índice de adaptação de códons (CAI) do cluster n-TASE, bem como outros genes comparados, foram calculados usando o software CAIcal server (<u>http://genomes.urv.es/CAIcal/</u>).

2.2.6 Busca de similaridade entre o n-TASE e os genes flanqueadores em Burkholderia spp.

Para a busca de similaridade, sequências de nucleotídeos recuperadas do banco de dados do IMG para todas as 24 linhagns bacterianas (listadas no item 2.2.4) foram comparadas com a sequência gênica (nucleotídeos) da linhagem TC3.4.2R3. Os genes comparados foram quinase (Bsem_02856), glicosiltransferase (Bsem_02857), metiltransferase (Bsem_02858), duas proteínas hipotéticas (Bsem_02859 e Bsem_02860) e chaperonina GROEL (Bsem_02861). A ferramenta "two sequence alignment" (alinhamento de duas sequências) no nucleotide BLAST - Local Basic Alignment Search Tool (BlastN) foi utilizada para essa comparação, utilizando as sequências de TC3.4.2R3 como "query". O alinhamento por protein BLAST - Local Basic Alignment Search Tool (BlastP) utilizando sequências de aminoácidos também foi realizado utilizando a ferramenta de alinhamento de duas sequências ("two sequence alignment"), utilizando as sequências de aminoácidos de TC3.4.2R3 como "query" para as linhagens *Burkholderia* sp. AU6039; *B. cenocepacia* DW 37E-2; *B. latens* AU17928; *Burkholderia* sp. AU31652; *Burkholderia* sp. HI2500 and *B. territori* MSMB1919WGS, em que pelo menos um dos genes do cluster n-TASE não apresentou alinhamento possível.

Cada um dos genes que compõem o n-TASE cluster em TC3.4.2R3 foi utilizado como "query" na busca no nucleotide BLAST (BlastN) comparando os genomas de Burkholderia (B. ambifaria AMMD; B. cenocepacia J2315; B. seminalis FL-5-4-10-S1-D7; Aquamicrobium sp. SK-2; Burkholderia sp. AU6039; B. cenocepacia DWS 37E-2; B. contaminans LMG23361; B. latens AU17928; Burkholderia sp. AU31652 Burkholderia sp. HI2500; Mumia flava MUSC201 e B. territori MSMB1919WGS) pelo alinhamento de duas sequências.

2.3 Resultados

2.3.1 Análise integrada de ilhas genômicas

A sequência do cluster n-TASE de *B. seminalis* TC3.4.2R3 não foi identificada, pelo IslandViewer, como uma potencial ilha genômica (Figura 2.1). A previsão baseada em IslandPath-DIMOB utiliza 6 sequências de ORFs (*Open Reading Frames*) como um cluster, uma vez que a utilização do viés dinucleotídico de um único ORF é altamente variável e análises anteriores baseadas em códons mostraram que é necessário um cluster mínimo de genes de aproximadamente 4,5 Kb (correspondendo a aproximadamente 6-8 ORFs) para a realização de uma estimativa confiável da composição de nucleotídeos. Além disso, o IslandPath não é eficaz na detecção de HGT de genes individuais ou ilhas obtidas de organismos com sinais de DNA semelhantes (HSIAO *et al.*, 2003). Na abordagem SIGI-HMM, a predição de GI (ilhas genômicas) é realizada no nível do gene (WAACK *et al.*, 2006). Gls geralmente variam em tamanho de 5-500 Kb, na predição IslandPick, GIs menores que 8 Kb não foram considerados como alvo da análise, assim, apenas aqueles com 8-31 Kb de tamanho podem ser preditos como GIs por esse método (LANGILLE; HSIAO; BRINKMAN, 2008).

Figura 2.1 - Predição de ilhas genômicas no cromossomo 1 de *B. seminalis* TC3.4.2R3, visualização circular dos GIs com blocos coloridos de acordo com a ferramenta de predição; IslandPick (verde), IslandPath-DIMOB (azul), SIGI-HMM (Iaranja), Islander (azul-turquesa), bem como os resultados integrados em vermelho. A região do cluster n-TASE está localizada entre 3.045.903 a 3.050.280 (Bsem_02857; Bsem_02858; Bsem_02859 e Bsem_02860)



FONTE: Tsui (2021)

<u>2.3.2 Análise comparativa da estrutura genética e detecção por PCR do cluster n-</u> TASE

A região codificante comum de 23.720 pb (compreendendo os genes Bsem_02847 ao Bsem_02869) de TC3.4.2R3 foi utilizada como referência para realização de uma análise comparativa de sintenia do mapa gênico (Figura 2.2) das linhagens de Burkholderia (apresentando o cluster n-TASE ou não). Os genes homólogos localizados upstream (Bsem_02847 até Bsem_02856) e downstream (Bsem_02861 até Bsem_02869) que flangueiam o cluster n-TASE foram considerados para a análise comparativa. A organização gênica foi construída com base no mapa gênico disponível no site do IMG (os genes e regiões intergênicas estão representados de acordo com o mapa gênico do banco de dados do IMG). A estrutura do cluster n-TASE bem como os genes que o flangueiam são conservados entre B. seminalis TC3.4.2R3 e B. cenocepacia DWS37E-2. Comparada às linhagens B. cenocepacia J2315, H111 e B. ambifaria AMMD, a estrutura dessa região é similar, com exceção da ausência do n-TASE cluster. Aquamicrobium sp. SK-2 e B. contaminans LMG23361 apresentam uma estrutura similar, incluindo a região do cluster n-TASE, mas apresentam uma "inserção extra" composta por 6 genes entre Bsem_02862 and Bsem_02863 (gene da co-chaperonin GroES e gene OprB porina seletiva de carboidrato, respectivamente em TC3.4.2R3) (Figura 2.2) que codifica proteínas homólogas ao sistema de transporte ABC ou transporte de ferro. A linhagem *B. seminalis* FL-5-4-10-S1-D7 apresentam essa "inserção extra" composta por genes relacionados ao transporte, porém o cluster n-TASE não está presente. A estrutura da região analisada contendo o cluster n-TASE é mais similar entre as linhagens *B.seminalis* TC3.4.2R3 e *B. cenocepacia* DWS37E-2, do que entre *B. seminalis* TC3.4.2R3 e *B. seminalis* FL-5-4-10-S1-D7.

Figura 2.2 - Comparação da região codificante comum de 23.720 pb (Bsem_02847 ao Bsem_02869 de TC3.4.2R3) em Aquamicrobium sp. SK-2, B. contaminans LMG23361, B. cenocepacia DWS37E-2, B. seminalis TC3.4.2R3, B. ambifaria AMMD, B. cenocepacia J2315, B. cenocepacia H111 e B. seminalis FL-5-4-10- S1-D7. A identificação do táxon NCBI está escrita ao lado do nome da linhagem. Os genes homólogos para todas as linhagens comparadas estão destacadas com a mesma cor de fundo (azul claro para genes adjacentes e amarelo para genes de cluster n-TASE) e ligados entre si, enquanto os genes não homólogos foram deixados com fundo branco. As cores dos genes correspondem à localização subcelular de seu produto gênico correspondente com base nos mapas genéticos disponíveis no "banco de dados Burkholderia Genome BD" (representado no quadrado do lado esquerdo). A composição dos seis genes da "inserção extra" está sublinhada em preto e sua função geral está descrita abaixo. Todas as linhagens apresentam identificação do locus tag acima da representação do gene. Identificação dos genes mais comumente descritos (Burkholderia Genome BD) abaixo da apresentação do gene correspondente: groEL, molecular chaperone GroEL; kinase, pyrimidine kinase; hp, hypothetical protein; MTF, methyltransferase; GTF, glycosyltransferas; EcfF, sigma factor 70; groES, co-chaperonin GroES; pyrR, bifunctional pyrimidine regulatory protein uracil phosphoribosyltransferase; pyrB, aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit; pyrX, dihydroorotase; **plsC**, 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase; and **apaH**, diadenosine tetraphosphatase



FONTE: Tsui (2021)

A análise por PCR confirmou uma região de 4,378 bp na linhagem TC3.4.2R3 que está ausente em *B. cenocepacia* H111 e outras linhagens de *B. seminalis* (linhagens da coleção BCCM/LMG), que apresentaram a amplificação de um produto de PCR de 500 pb (Figure 2.3).

Figura 2.3 - Detecção do cluster n-TASE por PCR em linhagens de *Burkholderia*. **A.** Representação para a região genética contendo o cluster n-TASE em TC3.4.2R3 e representação da região de outras *Burkholderia* (ausência de n-TASE). A posição dos primers, a posição esperada do amplicon e o tamanho estão representados. **MTF**, metiltransferase; **GTF**, glicosiltransferase; **groEL**, chaperonina GROEL; **kinase**, pirimidina quinase. **B.** Amplificação por PCR usando DNA de *B. seminalis* TC3.4.2R3, outras cinco *B. seminalis* (LMG19587, LMG24067, LMG24271, LMG24272 e LMG24273) e *B. cenocepacia* H111. **M**- marcador molecuar 1 Kb plus; **control** - controle negativo feito com dH2O. Todas as amostras foram corridas no mesmo gel. A seta preta indica o tamanho do produto de PCR obtido de TC3.4.2R3 (5.387 bp) e para todas as outras *Burkholderia* (> 500 bp)



FONTE: Tsui (2021)

2.3.3 Busca de similaridade de sequência e composição do genoma

A sequência do cluster n-TASE de TC3.4.2R3 apresentou identidade ≥80% e e-value de 9e-178 com quatro linhagens de *B. contaminans* (XI73, SK875, ZCC e CH-1). Não foram encontradas sequências homólogas de outras espécies de *Burkholderia* e nem de outras bactérias para a busca de similaridade dessa região do cluster n-TASE.

Foi realizada uma outra busca por sequências homólogas utilizando a ferramenta Gene Ortholog Neighborhoods no site do IMG Gene ID. A busca foi iniciada com o locus tag Bamb_0734 (locus tag do gene pirimidina quinase no genoma de *B. ambifaria* AMMD), sequências homólogas dos genes da pirimidina quinase, da chaperonina GROEL e do 16S rRNA de genomas representativos de *Burkholderia* foram recuperados do site do banco de dados do IMG. Para os genomas que contém a região do cluster n-TASE foi utilizada a mesma metodologia de busca, entre os genomas que retornaram com sequências homólogas do locus tag Bamb_0734, alguns desses genomas apresentam uma composição de um cluster de quatro genes entre os mesmos genes de pirimidina quinase, glicosiltransferase, metiltransferase, proteína hipotética, proteína hipotética e chaperonina GROEL) das linhagens foram recuperadas do banco de dados do IMG para análises posteriores.

Foram selecionadas 9 bactérias e 14 linhagens de *Burkholderia* com ou sem a sequência do cluster n-TASE (nomes das bactérias, identificação das linhagens e código de identificação NCBI taxon ID estão listados no item 2.2.1), para realização da filogenia do gene 16S rRNA, análise de conteúdo GC e identidade de nucleotídeos com a linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 (Figura 2.4). A análise filogenética baseada no gene do 16S rRNA revelou como previamente descrito, que *B. seminalis* é bastante próxima de *B. cenocepacia* e que a origem do cluster n-TASE não pode ser explicada por essa organização filogenética, sugerindo a existência de alguma relação evolutiva entre TC3.4.2R3 e outras linhagens de bactérias que apresentam sequências homólogas do cluster n-TASE. A linhagem *B. cenocepacia* DWS 37E-2 que apresenta a maior sintenia do cluster n-TASE com *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi agrupada em um clado completamente distinto de espécies de *B. cenocepacia*. Esses resultados sugerem que o cluster n-TASE apresenta uma longa história de evolução independente, apesar de que certamente existe um ancetral comum compartilhado entre essas linhagens que contém o cluster n-TASE.

Praticamente todas as sequências comparadas pertencem ao grupo do Bcc, constituindo linhagens patogênicas oportunistas, com exceção de *Paraburkholderia sacchari*, *B. gladioli*, e as linhagens não-*Burkholderia*. A diferença do conteúdo GC dos genes que compõem o n-TASE cluster, bem como os genes de pirimidina quinase e chaperonina GROEL, que o flanqueiam, é pequena para todas as sequências de *Burkholderia* comparadas (Figura 2.4, valores na cor vermelha). O conteúdo GC do gene pirimidina quinase para a maioria das *Burkholderia* comparadas, é de 69,4% a 70%, sendo levemente menor para *B. cenocepacia* DWS 37E-2 e *B. latens* AU17928, de 67,9%. Para o gene da chaperonina GROEL, o conteúdo GC para os quatro genes do cluster n-TASE apresentou um valor padrão entre 60% em TC3.4.2R3, esse valor de conteúdo GC também foi observado nas demais linhagens que apresentam esse cluster.

A linhagem Aquamicrobium sp. SK-2 apresentou a maior porcentagem de identidade de nucleotídeos para a região do cluster n-TASE comparada com TC3.4.2R3. Sendo 88% de identidade para o gene da glicosiltransferase, 86% para o gene da metiltransferase, 80% e 81% de identidade para as proteínas hipotéticas (Bsem_02859 e Bsem_02860, respectivamente). Algumas sequências apresentaram o resultado "no possible alignment" quando comparadas às sequências de nucleotídeos de TC3.4.2R3, como nas linhagens Burkholderia sp. HI2500, AU6039 e AU31652, em que o gene da metiltransferase não apresentou alinhamento correspondente (*ns* na Figura 2.4) com o gene da metiltransferase (Bsem_02858) de TC3.4.2R3. Para a linhagem B. cenocepacia DWS 37E-2, o alinhamento foi possível somente para a última proteína hipotética (61%), para B. latens AU17928, nenhum dos quatro genes apresentou um alinhamento possível com o cluster n-TASE de TC3.4.2R3. Grande parte das linhagens comparadas, apresentou uma identidade de nucleotídeos de 89% a 99% para os genes da pirimidina quinase e chaperonina GROEL, com exceção de B. contaminans LMG233361 (63% de identidade) e *B. cenocepacia* DWS 37E-2 (63% de identidade) (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Árvore filogenética de Neighboor-joining para o gene 16S rRNA (esquerda) com todas as *Burkholderia* obtidas do banco de dados IMG (contendo a sequência homóloga de n-TASE e não contendo). Os números em cada nó correspondem aos valores de *bootstrap*. A composição de nucleotídeos, conteúdo de GC (vermelho) e identidade de nucleotídeos (preto) estão posicionados na parte inferior da representação do gene. A representação genética corresponde a uma pirimidina quinase e uma chaperonina GROEL genes (ambos na cor laranja) e os quatro genes que compõem o cluster n-TASE (GTF, glicosiltransferase; MTF, metitransferase e dois hp, proteínas hipotéticas) representados na cor verde; ns, sequências sem possível alinhamento com os genes que compõem o cluster n-TASE em TC3.4.2R3. A seta laranja indica o nó filogenético em que n-TASE aparece em diferentes linhagens, incluindo TC3.4.2R3. A seta azul indica as linhagens mais próximas de TC3.4.2R3 (*B. cenocepacia* e *B. seminalis* - representadas com um quadrado azul) e a ausência de n-TASE nessas linhagens



Comparando a sequência de aminoácidos das linhagens (*Burkholderia* sp. AU6039; *B. cenocepacia* DW 37E-2; *B. latens* AU17928; *Burkholderia* sp. AU31652; *Burkholderia* sp. HI2500 and *B. territori* MSMB1919WGS) que apresentaram um resultado de "*no significant similarity found*" em pelos menos umdos genes que compõem o cluster n-TASE na busca por identidade de nucleotídeos, foi observado que os quatro genes que compõem o cluster n-TASE apresentou uma média de 76-87% de identidade de aminoácidos com o cluster n-TASE de TC3.4.2R3 (Figura 2.5), mas todas as sequências de chaperonina GROEL dessas linhagens apresentaram como resultado: "*no significant similarity*" para a comparação de aminoácidos (Figura 2.5).

Figura 2.5 - Comparação de identidade de sequências de nucleotídeos (azul claro) e aminoácidos (azul escuro) para linhagens contendo n-TASE, que mostraram uma "similaridade não significativa encontrada" em pelo menos um dos genes n-TASE na pesquisa de similaridade de sequência de nucleotídeos anterior (Figura 2.4). *ns*, sequências sem alinhamento possível



FONTE: Tsui (2021)

A análise do CAI (*Codon Adaptation Index*) foi realizada utlizando genes localizados *upstream* do cluster n-TASE (locus tag iniciando em Bsem_02850) e genes localizados *downstream* do cluster n-TASE (locus tag iniciando em Bsem_02870) para comparar se a composição do genoma "hospedeiro" de TC3.4.2R3 difere significativamente da sequência do cluster n-TASE. A análise do CAI não apresentou diferença significativa entre os genes entorno do cluster e do próprio cluster n-TASE. O valor CAI dos genes Bsem_02850 a Bsem_02856, bem como de Bsem_02861 a Bsem_02870 foi de 0,714 \pm 0,028 e para os genes do cluster n-TASE, o valor CAI foi de 0,7 \pm 0,009.

O mesmo cálculo foi realizado para as porcentagens de conteúdo GC, para os genes *upstream* e *downstream* do cluster n-TASE, foi observado que o valor do conteúdo GC foi de $69,5\% \pm 4,59$ enquanto para os genes do cluster n-TASE, o valor do conteúdo GC foi de $60,65\% \pm 2,24$. Por meio da realização da análise estatística t-test (p<0,05), os valores de conteúdo GC e CAI não se diferem entre eles.

2.3.4 Análise filogenética

Uma análise filogenética gene a gene foi realizada para decifrar a história evolutiva do cluster n-TASE utilizando sequências homólogas dos genes de diversas linhagens do gênero *Burkholderia* e também linhagens não-*Burkholderia* (como *Aquamicrobium* sp. e *Mumia flava*) (Figura 2.6). Genes da região do cluster n-TASE em outras linhagens são filogeneticamente distantes daqueles presentes em TC3.4.2R3. Interessantemente, os genes do cluster n-TASE em *Aquamicrobium* sp. SK-2 são mais próximos aos homólogos presentes em *B. contaminans* LMG23361 com relação às outras linhagens de *Burkholderia*.

As sequências dos genes da pirimidina quinase e chaperonina GROEL (locus tags Bsem_02856 e Bsem_02861 em TC3.4.2R3) foram concatenadas para construção de uma árvore filogenética (Figura 2.6A). As sequências de linhagens que não apresentam o cluster n-TASE se agruparam intimamente, porém as linhagens que apresentam a região do cluster n-TASE formaram dois clados, um deles é constituído por *B. cenocepacia* DWS 37-2, *B. latens* AU17928 e *B. territori* MSMB1919WGS e o segundo clado contempla todas as demais linhagens (Figura 2.6A).

A árvore filogenética construída somente com os genes da pirimidina quinase e chaperonina GROEL concatenados das linhagens que apresentam o cluster n-TASE (Figura 2.6B) também resultou na formação de um grupo distinto
para a sequência pirimidina quinase /chaperonina GROEL de TC3.4.2R3, apesar de codificar o mesmo produto gênico, apresentar a mesma organização genética, provavelmente esses genes apresentam uma história evolutiva completamente diferente.

A árvore filogenética de todos os quatro genes do cluster n-TASE apresenta cinco clados (Figura 2.6C), em que a sequência do cluster n-TASE de TC3.4.2R3 novamente não se agrupou com nenhuma outra sequência utilizada na análise, mas formou um grupo irmão com o clado composto pelas linhagens de *Aquamicrobium* sp. SK-2; *B. contaminans* LMG23361 e *Burkholderia* sp. (AU3165, HI2500 e AU6039). A comparação entre a filogenia do gene 16S rRNA (Figura 2.4) e a composição genética do cluster n-TASE e os genes que o flanqueiam (Figura 2.6 B e C) mostraram que não há congruência entre essas árvores filogenéticas.

A análise do conteúdo de GC não deu suporte à ideia de ter acontecido um evento de transferência horizontal com o cluster n-TASE, considerando que houve uma variação muito pequena entre os valores analisados. A análise da composição gênica baseada na comparação dos valores de CAI, também não se mostrou uma ferramenta efetiva para dar suporte à ideia da ocorrência de um evento de transferência horizontal. Por outro lado, a árvore filogenética do gene 16S rRNA revelou uma incongruência filogenética, visto que os grupos evolutivamente próximos de TC3.4.2R3 não apresentam a região do cluster n-TASE em seus genomas, permitindo inferir que o cluster n-TASE provavelmente possui uma longa história de aquisição horizontal.

Figura 2.6 - Árvores de Neighboor-joining do gene 16S rRNA, genes de cluster n-TASE e seus homólogos. A. Árvore filogenética com os genes de pirimidina quinase e chaperonina GROEL concatenados (todas as linhagens comparadas - com (verde) ou sem (vermelho) o cluster n-TASE);
B. Árvore filogenética com os genes de pirimidina quinase e chaperonina GROEL concatenados (apenas de linhagens que apresentamo cluster n-TASE);
C. Árvore filogenética com os quatro genes que compõem o cluster n-TASE concatenados





```
FONTE: Tsui (2021)
```

Foi realizada uma análise comparativa de diversas sequências gênicas de glicosiltransferases, para isso, 48 sequências putativas de glicosiltransferases foram selecionadas e recuperadas do banco de dados do site IMG. Das linhagens *B. cepacia* AMMD e *B. cenocepacia* DWS37E-2 foram recuperadas 5 sequências de glicosiltransferases; 7 sequências de *B. seminalis* FL-5-4-10-S1-D7 e *B. cenocepacia* H111; 2 sequências de *B. cenocepacia* J2315; 4 sequências de *B. contaminans* e 3 sequências de *Aquamicrobium* sp. SK-2 (Tabela 2.1).

No genoma de TC3.4.2R3, 15 sequências gênicas de glicosiltransferases com diversas anotações de classificação, incluindo a glicosiltransferase que compõe o cluster n-TASE, Bsem_02857, foram selecionadas. As linhagens que contém o gene homólogo de Bsem_02857 em TC3.4.2R3, tiveram as sequências homólogas selecionadas para essa análise comparativa [*Aquamicrobium* sp. SK-2 (Ga0098313_1081193); *B. contaminans* LMG23361 (WR31_RS18360) e *B. cenocepacia* DWS37Ee-2 (DM40_RS21930)].

O gene de glicosiltransferase Bsem_02857 (TC3.4.2R3_GTF11) se agrupou (nó G1) com as sequênicas de glicosiltransferases de *Aquamicrobium* sp. (SK2_GTF48) e *B. contaminans* LMG23361 (LMG 23361_GTF42), formando um grupo irmão (nó G2) com a sequência de glicosiltransferase DWS37E-2_GTF32 pertencente à linhagem *B. cenocepacia* DWS37E-2. Essas sequências formaram um grupo irmão (nó G3) com outro clado (nó G4, Figura 2.7) composto por três glicosiltransferases de *B. seminalis* FL-5-4-10-S1-D7 (FL-5-4-10-S1-D7_GTF19; FL-5-4-10-S1-D7_21 e FL-5-4-10-S1-D7_22) e uma sequência de *B. cenocepacia* H111 (H111_GTF41).

Apesar da distância filogenética observada na árvore do gene 16S rRNA, os genes homólogos de glicosiltransferase apresentam uma história evolutiva com a sequência de glicosiltransferase do n-TASE, 42% das glicosiltransferases selecionadasa de *B. seminalis* FL-5-4-10-S1-D7 se agruparam em um grupo-irmão com o clado que apresenta o gene Bsem_02857. Nenhuma das 14 glicosiltransferases selecionadas em TC3.4.2R3 se agrupou com Bsem_02857, assim, nenhum outro gene homólogo de Bsem_02857 está presente no genoma de TC3.4.2R3 (Figura 2.7). O gene Bsem_02857 provavelmente compartilha um ancetral comum com a glicosiltransferase homóloga de *Aquamicrobium* sp. SK-2 e *B. contaminans* LMG23361.

Figura 2.7 - Árvore de Maximum likelihood das sequências selecionadas de glicosiltransferases. Um clado distinto com a sequência do gene Bsem_02857 (TC3.4.2R3_GTF11) (destacado em cor verde no tamanho esquerdo) é formado, todos os outros genes de glicosiltransferase selecionados de TC3.4.2R3 não agruparam com Bsem_02857. As porcentagens de *bootstrap* estão apresentadas para todos os nós



FONTE: Tsui (2021)

Foram selecionadas 70 sequências de metiltransferases putativas para a realização de uma comparação gênica, a fim de se identificar possíveis sequências homólogas dentro do genoma de TC3.4.2R3 e até mesmo em outros 7 genomas bacterianos. Os genes selecionados apresentam uma diversa anotação de função e classificação. Entre elas, foram selecionadas 30 sequências de genes de metiltransferases (incluindo Bsem_02858) de TC3.4.2R3; 11 sequências de *B. seminalis* FL-5-4-10-S1-D7; 5 sequências de *B. cepacia* AMMD, de *B.cenocepacia* H111 e de *B. cenocepacia* J2315; 11 sequências de *B. cenocepacia* DWS37Ee-2; 4 sequências de *B. contaminans* LMG23361 e 9 sequências de *Aquamicrobium* sp. SK-2 (Tabela 2.1).

A frequência de sequências gênicas anotadas como metiltransferases mostrou-se bem variável entre as linhagens, *B. cepacia* AMMD, *B.cenocepacia* H111 *B. cenocepacia* J2315 e *B. contaminans* LMG23361 apresentaram menos sequências de metiltransferases disponíveis para selecionar. Os genes homólogos de Bsem_02858 das linhagens que contém o n-TASE foram incluídos nessa comparação [*Aquamicrobium* sp. SK-2 (Ga0098313_1081194); *B. contaminans* LMG23361 (WR31_RS18355) e *B. cenocepacia* DWS37Ee-2 (DM40_RS21925)]. As 70 sequências de metiltransferases putativas selecionadas para essa análise estão presentes em cromossomos. Genes de metiltransferases presentes em plasmídeos não foram considerados para essa comparação.

A árvore filogenética de metiltransferases, mostrou que a sequência de Bsem_02858 (TC3.4.2R3_MTF20) se agrupou com a metiltransferase de B. cenocepacia DWS 37E-2 (DWS 37E-2_MTF49) (nó M1, Figura 2.8), constituindo um grupo-irmão com o clado composto por metiltransferases de Aquamicrobium sp. SK-2 (SK2_MTF69); B. contaminans LMG23361 (LMG23361_58) (nó M3); esses dois grupos formam um clado (nó M2). As sequências foram recuperadas do banco de dados do site do IMG e o locus tag utilizado nesse banco de dados nem sempre é mesmo utilizado pelo site do "Burkholderia Genome DB" 0 (https://www.burkholderia.com/).

Os genes de metiltransferase que formaram um clado (nó M3) com a sequência do Bsem_02858 (TC3.4.2R3_MTF20) são os genes homólogos dos respectivos genomas de *Aquamicrobium* sp. SK-2 (Ga0098313_1081194); *B. contaminans* LMG23361 (WR31_RS18355) e *B. cenocepacia* DWS37Ee-2 (DM40_RS21925). Nenhuma das 19 metiltransferases selecionadas para comparação de TC3.4.2R3 se agrupou com o gene Bsem_02858. Ficou evidente que Bsem_02858 não compartilha nenhum ancestral comum com nenhuma outra sequência de metiltransferase comparada, mesmo aquelas consideradas homólogas. Nenhuma sequência de metiltransferase homóloga de Bsem_02858 está presente no genoma de TC3.4.2R3 (Figura 2.8). Todas as outras sequências de metiltransferases de TC3.4.2R3 se agruparam majoritariamente m dois grupos (nós marcados com um círculo vermelho na Figura 2.8).

Ambas transferases presentes no cluster n-TASE não apresentaram nenhuma similaridade e nem compartilham nenhuma origem evolutiva similar com as demais enzimas da mesma classe no genoma de TC3.4.2R3.

Figura 2.8 - Árvores de Maximum likelihood das sequências selecionadas de metiltransferase, há um clado distinto com a sequência do gene Bsem_02858. As porcentagens de *bootstrap* estão apresentadas para todos os nós



FONTE: Tsui (2021)

			Identificação na árvore
Locus tag (IMG website)	Produto gênico	Linhagem bacteriana	filogenética (Figuras 2.7 e 2.8)
	Glicosiltransferas	e	
Bsem_00107	group 1 glycosyl transferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF01
Bsem_00516	group 1 glycosyl transferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF02
Bsem_00689	glycosyl transferase family protein	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF03
Bsem_01221	glycosyl transferase family protein	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF04
Bsem_01321	lycosyl transferase family protein	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF05
Bsem_01324	glycosyl transferase family protein	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF06
Bsem_01349	glycosyl transferase, group 1	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF07
Bsem_01767	group 1 glycosyl transferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF08
Bsem_01805	glycosyl transferase family protein	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF09
Bsem_01806	glycosyl transferase family protein	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF10
Bsem_02857	family 2 glycosyl transferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF11
Bsem_02829	glycosyl transferase family protein	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF12
Bsem_02833	group 1 glycosyl transferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF13
Bsem_02846	diadenosine tetraphosphatase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF14
Bsem_02955	group 1 glycosyl transferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_GTF15

 Tabela 2.1 - Identificação de todas as sequências de glicosiltransferases e metiltransferases selecionadas para comparação

117

			Identificação na árvore
Locus tag (IMG website)	Produto gênico	Linhagem bacteriana	filogenética (Figuras 2.7 e
			2.8)
	Glicosiltransferase		
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-	
Ga0173025_11709	glycosyltransferase involved in cell wall biosynthesis	D7	FL-5-4-10-S1-D7_GTF16
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-	
Ga0173025_11838	glycosyltransferase involved in cell wall biosynthesis	D7	FL-5-4-10-S1-D7_GTF17
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-	
Ga0173025_11188	glycosyltransferase involved in cell wall biosynthesis	D7	FL-5-4-10-S1-D7_GTF18
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-	
Ga0173025_11718	GT2 family glycosyltransferase	D7	FL-5-4-10-S1-D7_GTF19
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-	
Ga0173025_11839	GT2 family glycosyltransferase	D7	FL-5-4-10-S1-D7_GTF20
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-	
Ga0173025_11825	GT2 family glycosyltransferase	D7	FL-5-4-10-S1-D7_GTF21
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-	
Ga0173025_11720	GT2 family glycosyltransferase	D7	FL-5-4-10-S1-D7_GTF22
Bamb_0669	glycosyl transferase, family 2	B. cepacia AMMD	AMMD_GTF23
Bamb_0767	glycosyl transferase, family 4	B. cepacia AMMD	AMMD_GTF24
Bamb_0762	glycosyl transferase, group 1	B. cepacia AMMD	AMMD_GTF25
Bamb_0163	glycosyl transferase, group 1	B. cepacia AMMD	AMMD_GTF26

			3
			Identificação na árvore
Locus tag (IMG website)	Produto genico	Linnagem bacteriana	110genetica (Figuras 2.7 e 2.8)
	Glicosiltransferase		
Bamb_0769	glycosyl transferase, group 1	B. cepacia AMMD	AMMD_GTF27
BCAL0848	putative glycosyltransferase	B. cenocepacia J2315	J2315_GTF28
BCAL0123	putative glycosyltransferase	B. cenocepacia J2315	J2315_GTF29
Ga0069351_11191	Glycosyltransferase involved in cell wall bisynthesis	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_GTF30
Ga0069351_11793	Glycosyltransferase involved in cell wall bisynthesis	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_GTF31
Ga0069351_11773	Glycosyltransferase involved in cell wall bisynthesis	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_GTF32
Ga0069351_11809	Glycosyltransferase, GT2 family	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_GTF33
	hydroxymethylpyrimidine/phosphomethylpyrimidine		
Ga0069351_11774	kinase	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_GTF34
Ga0325184_01_829064	glycosyltransferase involved in cell wall biosynthesis	B. cenocepacia H111	H111_GTF35
Ga0325184_01_820278	glycosyltransferase involved in cell wall biosynthesis	B. cenocepacia H111	H111_GTF36
Ga0325184_01_146504	glycosyltransferase involved in cell wall biosynthesis	B. cenocepacia H111	H111_GTF37
Ga0325184_01_683564	glycosyltransferase involved in cell wall biosynthesis	B. cenocepacia H111	H111_GTF38
Ga0325184_01_686125	glycosyltransferase involved in cell wall biosynthesis	B. cenocepacia H111	H111_GTF39
	glycosyltransferase involved in cell wall		
Ga0325184_01_690886	biosynthesis/tetratricopeptide (TPR) repeat protein	B. cenocepacia H111	H111_GTF40
Ga0325184_01_817997	GT2 family glycosyltransferase	B. cenocepacia H111	H111_GTF41
Ga0365917_04_2858671	glycosyltransferase involved in cell wall biosynthesis	B. contaminans LMG 23361	LMG 23361_GTF42
Ga0128860_10281	Glycosyltransferase involved in cell wall bisynthesis	B. contaminans LMG 23361	LMG 23361_GTF43
Ga0128860_101237	Glycosyltransferase involved in cell wall bisynthesis	B. contaminans LMG 23361	LMG 23361_GTF44

continuação

			3
Locus tag (IMG website)	Produto gênico	Linhagem bacteriana	Identificação na árvore filogenética (Figuras 2.7 e
			2.8)
	Glicosiltransferase		
Ga0128860_101112	glycosyltransferase, MGT family	B. contaminans LMG 23361	LMG 23361_GTF45
Ga0098313_100685	Glycosyltransferase involved in cell wall bisynthesis	Aquamicrobium sp. SK-2	SK-2_GTF46
Ga0098313_1006103	Glycosyltransferase involved in cell wall bisynthesis	Aquamicrobium sp. SK-2	SK-2_GTF47
Ga0098313_1081193	Glycosyltransferase involved in cell wall bisynthesis	Aquamicrobium sp. SK-2	SK-2_GTF48
	Metiltransferase		
Bsem_00147	uroporphyrin-III C/tetrapyrrole methyltransferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF01
Bsem_00469	uroporphyrin-III C/tetrapyrrole methyltransferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF02
Bsem_00639	methyltransferase type 11	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF03
Bsem_01085	uroporphyrin-III C-methyltransferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF04
Bsem_01101	precorrin-3b C17-methyltransferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF05
Bsem_01285	protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF06
Bsem_01480	tRNA/rRNA methyltransferase (SpoU)	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF07
	N5-glutamine S-adenosyl-L-methionine-dependent		
Bsem_01508	methyltransferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF08
Bsem_01581	methyltransferase type 12	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF09
	bifunctional uroporphyrinogen-III		
Bsem_01904	synthetase/uroporphyrin-III C-methyltransferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF10
Bsem_01907	methyltransferase type 11	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF11
Bsem_02020	type 11 methyltransferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF12

119

			Identificação na árvore	
Locus tag (IMG website)	Produto gênico	Linhagem bacteriana	filogenética (Figuras 2. 7 e	
			2.8)	
	Metiltransferase			
Bsem_02204	thiopurine S-methyltransferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF13	
Bsem_02286	putative methyltransferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF14	
Bsem_02327	methyltransferase type 11	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF15	
Bsem_02764	methyltransferase type 11	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF16	
Bsem_02838	type 11 methyltransferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF17	
Bsem_03094	16S ribosomal RNA methyltransferase RsmE	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF18	
Bsem_01358	glycine cleavage T protein (aminomethyl transferase)	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF19	
Bsem_02858	Mg-protoporphyrin IX methyl transferase	B. seminalis TC3.4.2R3	TC3.4.2R3_MTF20	
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-		
Ga0173025_11157	aminomethyltransferase	D7	FL-5-4-10-S1-D7_MTF21	
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-		
Ga0173025_11197	CheR-type MCP methyltransferase	D7	FL-5-4-10-S1-D7_MTF22	
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-		
Ga0173025_11694	ketopantoate hydroxymethyltransferase	D7	FL-5-4-10-S1-D7_MTF23	
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-		
Ga0173025_11746	serine hydroxymethyltransferase	D7	FL-5-4-10-S1-D7_MTF24	
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-		
Ga0173025_1139	dimethylhistidine N-methyltransferase	D7	FL-5-4-10-S1-D7_MTF25	
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-		
Ga0173025_11168	methyltransferase family protein	D7	FL-5-4-10-S1-D7_MTF26	

120

			001101101013010
			Identificação na árvore
Locus tag (IMG website)	Produto gênico	Linhagem bacteriana	filogenética (Figuras 2.7 e 2.8)
	Metiltransferase		
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-	
Ga0173025_11438	methyltransferase family protein	D7	FL-5-4-10-S1-D7_MTF27
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-	
Ga0173025_11174	methyltransferase family protein	D7	FL-5-4-10-S1-D7_MTF28
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-	
Ga0173025_11171	methyltransferase family protein	D7	FL-5-4-10-S1-D7_MTF29
	predicted 3-demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	B. seminalis FL-5-4-10-S1-	
Ga0173025_11204	(glyoxalase superfamily)	D7	FL-5-4-10-S1-D7_MTF30
		B. seminalis FL-5-4-10-S1-	
Ga0173025_11858	protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	D7	FL-5-4-10-S1-D7_MTF31
Bamb_0401	methyltransferase small	B. cepacia AMMD	AMMD_MTF32
Bamb_0789	protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	B. cepacia AMMD	AMMD_MTF33
Bamb_0150	putative methyltransferase	B. cepacia AMMD	AMMD_MTF34
Bamb_0455	S-adenosyl-methyltransferase MraW	B. cepacia AMMD	AMMD_MTF35
Bamb_0020	Site-specific DNA-methyltransferase (adenine-specific)	B. cepacia AMMD	AMMD_MTF36
BCAL0747	putative methyltransferase	B. cenocepacia J2315	J2315_MTF37
BCAL0006	putative protein lysine methyltransferase protein	B. cenocepacia J2315	J2315_MTF38
BCAL0877	putative methyltransferase	B. cenocepacia J2315	J2315_MTF39
BCAL0075	aminomethyltransferase	B. cenocepacia J2315	J2315_MTF40

continuação

Locus tag (IMG website)	Produto gênico	Linhagem bacteriana	Identificação na árvore filogenética (Figuras 2.7 e 2.8)
	Metiltransferase		
	[protein release factor]-glutamine N5-methyltransferase		
BCAL0373	(EC 2.1.1)	B. cenocepacia J2315	J2315_MTF41
Ga0069351_11156	aminomethyltransferase	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_MTF42
Ga0069351_11200	MCP methyltransferase, CheR-type	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_MTF43
Ga0069351_11716	serine hydroxymethyltransferase	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_MTF44
Ga0069351_1140	adenine-specific DNA-methyltransferase	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_MTF45
Ga0069351_1135	dimethylhistidine N-methyltransferase	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_MTF46
Ga0069351_11178	Methyltransferase domain-containing protein	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_MTF47
Ga0069351_11175	Methyltransferase domain-containing protein	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_MTF48
Ga0069351_11772	Methyltransferase domain-containing protein	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_MTF49
Ga0069351_11448	Methyltransferase domain-containing protein	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_MTF50
Ga0069351_11172	Methyltransferase domain-containing protein	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_MTF51
Ga0069351_11828	protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	B. cenocepacia DWS 37E-2	DWS 37E-2_MTF52
Ga0325184_01_1049541	16S rRNA (cytidine1402-2'-O)-methyltransferase	B. cenocepacia H111	H111_MTF53
Ga0325184_01_92226	aminomethyltransferase	B. cenocepacia H111	H111_MTF54
Ga0325184_01_725227	glycine hydroxymethyltransferase	B. cenocepacia H111	H111_MTF55
Ga0325184_01_848430	protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	B. cenocepacia H111	H111_MTF56
Ga0325184_01_389192	release factor glutamine methyltransferase	B. cenocepacia H111	H111_MTF57
Ga0128860_108103	Methyltransferase domain-containing protein	B. contaminans LMG 23361	LMG 23361_MTF58
Ga0128860_10117	Phospholipid N-methyltransferase	B. contaminans LMG 23361	LMG 23361_MTF59

continuação

			Identificação na árvore
Locus tag (IMG website)	Produto gênico	Linhagem bacteriana	filogenética (Figuras 2.7 e
			2.8)
	Metiltransferase		
Ga0128860_101172	protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	B. contaminans LMG 23361	LMG 23361_MTF60
Ga0128860_102110	Thiopurine S-methyltransferase (TPMT)	B. contaminans LMG 23361	LMG 23361_MTF61
Ga0098313_100719	aminomethyltransferase	Aquamicrobium sp. SK-2	SK2_MTF62
Ga0098313_100538	serine hydroxymethyltransferase	Aquamicrobium sp. SK-2	SK2_MTF63
Ga0098313_100553	aminomethyltransferase	Aquamicrobium sp. SK-2	SK2_SK2
	Glyoxalase superfamily enzyme, possibly 3-		
Ga0098313_10014	demethylubiquinone-9 3-methyltransferase	Aquamicrobium sp. SK-2	SK2_MTF65
Ga0098313_100698	Macrocin-O-methyltransferase (TylF)	Aquamicrobium sp. SK-2	SK2_MTF66
Ga0098313_100842	Methyltransferase domain-containing protein	Aquamicrobium sp. SK-2	SK2_MTF67
Ga0098313_1002165	Methyltransferase domain-containing protein	Aquamicrobium sp. SK-2	SK2_MTF68
Ga0098313_1081194	Methyltransferase domain-containing protein	Aquamicrobium sp. SK-2	SK2_MTF69
Ga0098313_101084	Thiopurine S-methyltransferase (TPMT)	Aquamicrobium sp. SK-2	SK2_MTF70

123

2.4 Discussão

Os organismos podem adquirir genes ou fragmentos de DNA ultrapassando as barreiras entre espécies por meio da transferência gênica horizontal (HGT) que acelera a evolução e inovação em genomas, uma vez que é responsável por introduzir genes recentemente evoluídos de organismos doadores para o organismo receptor evitando etapas lentas da criação gênica *ab initio* (JAIN *et al.*, 1999; JAIN *et al.*, 2003). Alguns genes com funções especiais, como aqueles responsáveis pela resistência a antibióticos e adaptação a ambientes extremos, provavelmente são adquiridos pelas espécies por meio de eventos de HGT (HANAGE *et al.*, 2009; GOOTZ, 2010), permitindo que as mais diversas espécies ocupem diferentes nichos.

Apesar de o programa de predição de GIs, IslandViewer, ter indicado diversas regiões do cromossomo 1 como resultantes de um evento de HGT, o cluster n-TASE não foi detectado por ele como uma região originária de um evento de transferência horizontal. Considerando que os padrões "ab initio" ou parâmetros paramétricos que contam com a composição da sequência e assinaturas genômicas (composição nucleotídica, espectro de oligonucleotídeo, características estruturais do DNA e contexto genômico) não são suficientemente sensíveis para detectar pequenos padrões de anormalidade e então determinar se a região analisada corresponde a uma ilha genômica e portanto, se foi adquirida por HGT (RAVENHALL *et al.*, 2015). Além disso, o cluster n-TASE tem 4,378 pb, podendo dificultar a análise por programas de predição automatizada, uma vez que uma das ferramentas que compõe o IslandViewer é o IslandPath-DIMOB e ele requer um tamanho mínimo de cluster de 4,5 Kb para estimativa confiável da composição nucleotídica (HSIAO *et al.*, 2003).

Araújo *et al.* (2016) avaliaram o genoma de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e encontraram um cluster gênico de 4.378 pb composto por quatro genes, correspondente aos locus tags Bsem_02857 até o Bsem_02860. Curiosamente, esse cluster de quatro genes, denominado cluster n-TASE no presente estudo, não foi encontrado na linhagem também pertencente ao grupo Bcc filogeneticamente mais próxima de TC3.4.2R3, *B. cenocpacia* J2315. Dessa forma, o objetivo nessa etapa de pesquisa foi determinar se o cluster n-TASE foi adquirido horizontalmente

ou não de uma linhagem doadora não-*Burkholderia* para um ancestral das linhagens do grupo Bcc, ou se o evento de HGT ocorreu de forma exclusiva na linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3 strain.

Métodos indiretos de detecção para transferência gênica horizontal desenvolvidos dependem da detecção de padrões de composição diferenciados de sequências de nucleotídeos (RAGAN, 2001; PUTONTI *et al.*, 2006). Baseado na premissa de que sequências que foram transferidas horizontalmente de um doador distinto para um novo receptor devem apresentam uma composição nucleotídica diferente (ROCHA *et al.*, 2006). Com o intuito de inspecionar os padrões e a causa do uso de códons, muitos índices foram projetados para acessar o grau e direção dos viéses de códons. Entre eles, o índice de adaptação do códon (CAI - *Codon Adaptation Index*) foi proposto como uma estimativa do uso de códons de um gene relativo a um conjunto de genes de referência. O valor de CAI varia de 0 a 1,0, sendo que valores altos significam que o gene em questão tem um padrão de uso de códon semelhante ao dos genes de referência (SHARP *et al.*, 1987).

Eventos de transferência horizontal podem ser detectados por métodos de substituição (*surrogate methods*), os quais não requerem construção de árvores filogenéticas ou outras análises filogenéticasa diretas (RAGAN, 2001). A principal desvantagem desses métodos é a alta taxa de falsos positivos. Foi demonstrado que a variação intragenômica do viés do códon pode ser grande o suficiente para ser confundida com a variação significativa verdadeira que, de outra forma, seria atribuída à transferência horizontal (GUINDON; PERRIÈRE, 2001). Além disso, Koski *et al.* (2001) sugeriu que tanto o viés do códon quanto os índices de composição de base, índices comuns usados em métodos substitutos, são indicadores fracos de transferência horizontal.

Com base no viés do códon (representado pela análise do CAI no presente estudo) e composição de nucleotídeos (conteúdo GC e identidade de nucleotídeos entre genes comparados de linhagens selecionadas), não foram observadas diferenças nesse padrão, sugerindo que se houve um evento de HGT, a espécie doadora apresenta características semelhantes à *Burkholderia* spp. Além disso, a comparação entre os genes do cluster n-TASE e suas características de composição de base de genes adjacentes também não mostrou diferenças significativas. O poder de resolução dos métodos substitutos também é uma fragilidade remanescente, considerando o tempo decorrido desde a ocorrência da transferência horizontal (MARRI; GOLDING, 2008). Os genes que foram inseridos em um genoma hospedeiro via HGT irão adquirir o padrão de uso de códon do genoma do hospedeiro e os valores de composição por meio de um fenômeno chamado *amelioration* (MARRI; GOLDING, 2008). Esse fenômeno leva à redução da variação composicional, reduzindo então, a sensibilidade dos métodos substitutos (BECQ *et al.*, 2010). Também foi sugerido que, para integração e manutenção bemsucedidas de genes no genoma hospedeiro após um evento de transferência horizontal, tanto o genoma receptor quanto os genes transferidos devem ter compatibilidade com viés de códon (MEDRANO-SOTO *et al.*, 2004), sugerindo que genes com códons muito divergentes poderiam apresentar seleção contrária no processo de manutenção no genoma hospedeiro.

Apesar da eficácia duvidosa dos métodos substitutos e da falta de obtenção de evidências de HGT com base nesses métodos, existem métodos comparativos, que contam com a existência de dados de sequências evolutivas relacionadas para identificar a transferência horizontal de genes em uma determinada espécie ou grupo de espécies. Este grupo de metodologias inclui análise filogenética, abordagens filogenômicas e análise estatística de índices filogenéticos. Os métodos comparativos mostraram-se mais sensíveis e específicos (POPTSOVA; GOGARTEN, 2007) em relação aos métodos substitutos.

Infere-se que metade das famílias de genes de *Burkholderia* possivelmente já passaram por um evento de HGT pelo menos uma vez durante sua evolução. O processo de ganho e perda de genes parece ser uma tendência predominante na evolução de *Burkholderia* spp. No ancestral de *Burkholderia* e nos ramos ancestrais dos principais clados, ocorreu um grande número de aquisições de genes. O ancestral comum de *Burkholderia* tinha um número estimado de 1.335 genes adquiridos em comparação com o grupo externo de outras Burkholderiaceae (ZHU *et al.,* 2011).

A avaliação, por PCR, da presença da sequência do cluster n-TASE em *B. seminalis* TC3.4.2R3 e em outras linhagens de *Burkholderia seminalis* indicou que esse cluster n-TASE está presente apenas em TC3.4.2R3. Reforçando a hipótese de

aquisição por transferência horizontal, uma vez que as cinco *B. seminalis* e *B. cenocepacia* H111 não apresentaram estes genes.

Foram realizadas comparações filogenéticas dos genes que compõem o cluster n-TASE, entre linhagens próximas de TC3.4.2R3 e espécies que foram utilizadas na comparação por apresentarem homólogos dos genes em questão como *Aquamicrobium* sp. e *Mumia flava*. Acredita-se que se um ancetral comum das linhagens do grupo Bcc tivesse sido alvo do evento de HGT, então os genes do cluster n-TASE estariam presentes em todas as linhagens do Bcc comparadas, o que não foi observado. Por outro lado, se a direção da transferência fosse de um doador para a espécie *B. seminalis*, seria esperado que todos os genomas de *B. seminalis* comparados (e disponíveis) mostrassem a sequência do cluster n-TASE.

Conforme os resultados apresentados, nenhuma das linhagens de *B. seminalis* no banco de dados IMG possui o cluster n-TASE, além disso, o DNA genômico de cinco *B. seminalis*, isoladas de amostras ambientais e clínicas, também não apresentam o n-TASE na análise de detecção de PCR. Assim, acredita-se que a aquisição do cluster n-TASE em TC3.4.2R3 tenha ocorrido em um único evento nesta linhagem endofítica isolada de rizosfera de cana-de-açúcar.

Em Aquamicrobium sp. SK-2 e Mumia flava MUSC201 foi encontrada uma sequência completa com estrutura e anotação homóloga ao cluster n-TASE. Além disso, com base no banco de dados Burkholderia Genome BD (https://www.burkholderia.com/), existem 17 linhagens de Burkholderia apresentando o cluster n-TASE (5,93%) em um banco de dados de 287 genomas completos de Burkholderia, entre elas, B. contaminans, B. latens e a maioria pertencentes à espécie B. territorri (76%).

Provavelmente, o cluster n-TASE presente nessas espécies foi transferido de um doador comum, mas o índice de mutação e adaptação do n-TASE após a integração do fragmento de DNA adquirido por HGT evoluiu independentemente no genoma de TC3.4.2R3 justificando suas características únicas e baixa porcentagem de identidade com outras sequências. Essa distribuição aleatória pode ser resultado de eventos HGT independentes ou perdas frequentes de todo o cluster em linhagens diferentes (Figura 2.2). A primeira explicação parece ser mais provável, porque as árvores filogenéticas de genes do cluster têm topologias que estão em ampla incongruência com a filogenia de espécies esperada (Figuras 2.4 e 2.6).

Qualquer árvore mostrando aparente HGT de um gene também pode ser explicada por um cenário alternativo de duplicações e perdas de genes (KHALDI et al., 2008). No entanto, a situação relatada aqui é bastante diferente dos casos típicos de duplicação e perda de genes. A ausência de genes homólogos de glicosiltransferase e metiltransferase para Bsem_02857 e Bsem_02858 em todos os genomas contendo n-TASE de linhagens comparadas revela que não há possibilidade de um evento de duplicação gênica. Se houvesse um evento de perda de genes, as árvores filogenéticas do cluster n-TASE estariam de acordo com a filogenia evolutiva das espécies (KHALDI et al., 2008). Além disso, um cenário de perda de genes exigiria a perda precisa de exatamente um cluster de quatro genes em 638 linhagens de Burkholderia (de acordo com o banco de dados do Genoma de Burkholderia). Esses quatro genes, aparentemente agrupados, não necessariamente formam um operon funcional (e não foram providenciadas evidências até o momento). Considerando que genes da mesma via são frequentemente agrupados e co-expressos em condições particulares, e se esse fenômeno de agrupamento ocorre em um único locus certamente facilita a HGT desses genes envolvidos na mesma função celular (LAWRENCE, 1999; WALTON, 2000). Devido à necessária natureza precisa da deleção gênica (e escolha da cópia do gene a ser excluída), esse cenário não é considerado como provável. A distribuição descontínua do cluster n-TASE entre as espécies de Burkholderia sugere que as restrições evolutivas atuam para manter este cluster apenas em algumas espécies.

Foi observado um clado monofilético ao comparar o cluster n-TASE de TC3.4.2R3 e as sequências homólogas em *Aquamicrobium* sp. SK-2 e *B. contaminans* LMG23361. *B. contaminans* LMG23361 é a linhagem tipo da espécie, isolada do leite de uma ovelha leiteira com mastite (VANLAERE *et al.,* 2009). *B. contaminans* também foi encontrada como contaminante de produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (PPCPs - Pharmaceuticals and personal care products) e ligada a surtos, essa linhagem é capaz de degradar cloreto de benzalcônio (BZKs), uma das principais formulações anti-sépticas para PPCPs, em níveis mais elevados do que as outras linhagens do grupo Bcc (AHN *et al.*, 2016). Além disso, *B. contaminans* foi também isolado de um solo com propriedades de suprimir uma doença de manchas marrons de grama, além disso, desse isolado de *B. contaminans* foi purificao um composto antifúngico denominado ocidiofungina (LU *et al.*, 2009). A ocidiofungina isolada de *B. contaminans* LMG23361 demonstrou potente atividade antifúngica contra diversos fungos como *Pythium* spp. (LU *et al.*, 2009). Por outro lado, *Aquamicrobium* sp. SK-2 isolado de uma estação de tratamento de esgoto é considerado um bom candidato para a biorremediação de solos contaminados com bifenilos policlorados (PCBs), bem como demais poluentes orgânicos no meio ambiente e responsáveis por causar sérios problemas ambientais ao redor no mundo, especialmente em solos altamente salinos (CHANG *et al.*, 2003).

Embora as linhagens de *Burkholderia* que apresentam o cluster n-TASE são patógenos oportunistas (*B. seminalis, B. contaminans, B. cenocepacia, B. latens* e *B. territori*), a espécie *Aquamicrobium* sp. não foi associada a nenhum comportamento patogênico até o momento.

Com base nesses dados, especula-se uma possível relação do cluster n-TASE em processos relacionados a aplicações biotecnológicas como atividade antimicrobiana ou degradação de poluentes. Acredita-se que os produtos gênicos produzidos por esse cluster possam ser importantes indiretamente em uma via biossintética crucial para essas características biotecnológicas interessantes. A presença do cluster n-TASE em TC3.4.2R3 pode ter surgido de uma seleção envolvendo um papel biológico desconhecido de algum metabólito nessa bactéria. Dessa forma, a identificação das funções associadas ao cluster n-TASE será necessária para entender o papel do cluster n-TASE na biologia de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e poderá dar pistas sobre a evolução do doador ancestral desse cluster.

Uma biblioteca de mutantes de transposon de *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi gerada e avaliada para identificar mutantes defectivos na atividade de biocontrole da necrose de orquídea (ARAÚJO *et al.,* 2016), bem como para atividade antifúngica (NEVES, 2011). Mais de 3.800 mutantes foram obtidos e testados individualmente para biocontrole de necrose de orquídea e atividade antifúngica defectivos. Neves (2011) observou que o mutante M30 teve o gene Bsem_02858

(gene da metiltransferase) interrompido pelo mini-transposon Tn5 e apresentou um fenótipo antifúngico diferente em comparação à linhagem selvagem TC3.4.2R3. O fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* não foi inibido pelo M30. Neves (2011) relacionou a metiltransferase Bsem_02858 e de alguma forma todo o cluster n-TASE com a capacidade de produção de compostos antifúngicos por TC3.4.2R3. A verificação dessa hipótese só seria possível por meio de experimentos de nocaute gênico para a caracterização da função gênica e compreensão da via de biossíntese na qual o n-TASE poderia fazer parte direta ou indiretamente.

O cluster n-TASE tem uma história complexa com vários eventos de HGT independentes tanto em linhagens de *Burkholderia* como em linhagens não-*Burkholderia*. Não se trata de um cluster gênico comumente compartilhado entre linhagens da mesma espécie, mas ocorre independentemente dentro de uma ou algumas linhagens de algumas *Burkholderia*. Pode parecer mais simples sugerir que o cluster n-TASE sempre ocorre como um evento HGT independente dentro das linhagens bacterianas, acredita-se que se um único evento de HGT tivesse originado todas as sequências presentes nas linhagens que possuem o n-TASE, seria esperado que a árvore filogenética dos genes do n-TASE formasse um único grupo monofilético, o que não foi observado, ao invés disso, foram observados diferentes clados compostos por linhagens distribuídas de forma aleatória, nem ao menos relacionadas evolutivamente. O padrão de distribuição esporádica de n-TASE entre as espécies é consistente com a ideia de eventos independentes de HGT. A organização dos genes adjacentes (ordem e orientação) é conservada entre as linhagens comparadas (Figura 2.2).

Neste estudo, foi demonstrado que o cluster n-TASE provavelmente resultou da transferência horizontal de um doador comum compartilhado entre *B. seminalis* TC3.4.2R3, *Aquamicrobium* sp. SK-2 e *B. contaminans* LMG23361, sendo muito mais provável um doador evolutivamente próximo ao gênero *Burkholderia* por meio de qualquer um dos mecanismos de HGT existentes em procariotos. A distância genética entre espécies biológicas influencia os eventos de HGT, visto que a transferência gênica é mais frequentemente observada entre espécies relacionadas e menos comum em espécies filogeneticamente distantes (WOLF *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 2007).

Wagner e Chaux (2008) estudaram 438 genomas procarióticos completos e descobriram que 30 casos de transferência gênica ocorreram entre clados distantemente relacionados, apoiando a menor frequência de ocorrência de HGT em espécies evolutivamente distantes. O mecanismo pelo qual HGT pode ter ocorrido permanece uma questão de especulação. Os procariotos geralmente realizam transferência horizontal de material genético por meio de sistemas de secreção Tipo IV (JUHAS; CROOK; HOOD, 2008), conjugação (WEINERT *et al.*, 2009), transformação (FALL *et al.*, 2007) ou transdução (ZANEVELD *et al.*, 2008), todos sendo mecanismos biológicos que facilitam a troca de DNA.

2.5 Conclusões

Nesta etapa do estudo, a evolução do cluster n-TASE de *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi investigada, com o objetivo de buscar sua origem. Assim, foi realizada uma busca por homólogos de genes que compõem o n-TASE em bancos de dados de sequências gênicas disponíveis ao público. A abordagem falhou em identificar quaisquer homólogos de n-TASE em uma ampla gama de espécies bacterianas não pertencentes ao gênero *Burkholderia*. Foi detectada a presença de uma sequência homóloga ao cluster n-TASE em algumas *Burkholderia*, porém a presença dessa sequência não é compartilhada entre as demais linhagens da mesma espécie. A análise do conteúdo de GC e dos valores de CAI mostrou que o cluster n-TASE adquirido apresenta características semelhantes às observadas para outras espécies de *Burkholderia*.

Com base na detecção por PCR e principalmente na análise filogenética, foi possível fornecer evidências de que o n-TASE foi adquirido por meio de um evento de HGT. Assim, a inativação de genes desse cluster de quatro genes e a análise dos fenótipos resultantes poderiam elucidar o envolvimento desse cluster de quatro genes na interação dessa bactéria no meio ambiente.

Pode-se concluir que há suporte filogenético para a hipótese de que os quatro genes que formam o cluster n-TASE em TC3.4.2R3 foram originados por HGT, com a presente análise não foi possível determinar exatamente a linhagem doadora, muito provavelmente um doador comum (não necessariamente relacionado a *Burkholderia*) para o cluster n-TASE em *Aquamicrobium* sp. SK-2 e *B*. contaminans LMG233361 também. Com base na similaridade da composição de nucleotídeos entre as sequências do cluster n-TASE comparadas (Figura 2.3), acredita-se na existência de um doador comum contendo o cluster n-TASE, e sua transferência ocorreu de forma independente através da espécie, de acordo com seu comportamento, requisitos ambientais ou necessidades de adaptação. Com os dados atuais, não é possível afirmar qual foi a linhagem doadora mais provável, devido à falta de disponibilidade de um maior número de sequências n-TASE para realizar uma comparação completa. É possível reforçar que o evento HGT não ocorreu em todas as linhagens do grupo Bcc, e também ele não ocorreu especificamente na espécie *B. seminalis*, mas, pontualmente, na linhagem TC34.2R3.

REFERÊNCIAS

AHN, Y. *et al*. Intrinsic resistance of Burkholderia cepacia complex to benzalkonium chloride. **MBio**, v. 7, n. 6, p. e01716-16, 2016.

ARAÚJO, F. D. S. *et al.* Desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging reveals chemical defense of Burkholderia seminalis against cacao pathogens. **RSC advances**, v. 7, n. 48, p. 29953-29958, 2017.

ARAÚJO, F. D. S.; ARAÚJO, W. L.; EBERLIN, M. N. Potential of *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 as Biocontrol Agent Against *Fusarium oxysporum* Evaluated by Mass Spectrometry Imaging. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, 2017.

ARAÚJO, W. L. *et al.* Genome sequencing and transposon mutagenesis of Burkholderia seminalis TC3. 4.2 R3 identify genes contributing to suppression of orchid necrosis caused by B. gladioli. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29, n. 6, p. 435-446, 2016.

BATADA, N. N.; HURST, L. D. Evolution of chromosome organization driven by selection for reduced gene expression noise. **Nature genetics**, v. 39, n. 8, p. 945-949, 2007.

BECQ, J.; CHURLAUD, C.; DESCHAVANNE, P. A benchmark of parametric methods for horizontal transfers detection. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e9989, 2010.

BERTELLI, C. *et al.* IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. **Nucleic acids research**, v. 45, n. W1, p. W30-W35, 2017.

CHAIN, P. S. G. *et al.* Burkholderia xenovorans LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 42, p. 15280-15287, 2006.

CHANG, Y. C. *et al.* Whole-genome sequence of Aquamicrobium sp. strain SK-2, a polychlorinated biphenyl-utilizing bacterium isolated from sewage sludge. **Genome announcements**, v. 3, n. 3, 2015.

CHOI, I. G.; KIM, S. H. Global extent of horizontal gene transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 11, p. 4489-4494, 2007.

DARSANDHARI, S. *et al.* Characterization of regioselective flavonoid Omethyltransferase from the Streptomyces sp. KCTC 0041BP. **Enzyme and microbial technology**, v. 113, p. 29-36, 2018.

EBERL, L.; VANDAMME, P. Members of the genus Burkholderia: good and bad guys. **F1000Research**, v. 5, 2016.

FALL, S. *et al*. Horizontal gene transfer regulation in bacteria as a "spandrel" of DNA repair mechanisms. **PloS one**, v. 2, n. 10, p. e1055, 2007.

FLÓREZ, L. V. *et al.* An antifungal polyketide associated with horizontally acquired genes supports symbiont-mediated defense in Lagria villosa beetles. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2018.

FLÓREZ, L. V. *et al.* Antibiotic-producing symbionts dynamically transition between plant pathogenicity and insect-defensive mutualism. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2017.

FLÓREZ, L. V.; KALTENPOTH, M. Symbiont dynamics and strain diversity in the defensive mutualism between Lagria beetles and Burkholderia. **Environmental microbiology**, v. 19, n. 9, p. 3674-3688, 2017.

GONÇALVES, P. J. R. O. *et al.* Environmental interactions are regulated by temperature in Burkholderia seminalis TC3. 4.2 R3. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

GOOTZ, T. D. The global problem of antibiotic resistance. **Critical Reviews™ in Immunology**, v. 30, n. 1, 2010.

GUINDON, S.; PERRIERE, G. Intragenomic base content variation is a potential source of biases when searching for horizontally transferred genes. **Molecular biology and evolution**, v. 18, n. 9, p. 1838-1840, 2001.

HANAGE, W. P. *et al.* Hyper-recombination, diversity, and antibiotic resistance in pneumococcus. **Science**, v. 324, n. 5933, p. 1454-1457, 2009.

HANUSZKIEWICZ, A. *et al.* Identification of the flagellin glycosylation system in Burkholderia cenocepacia and the contribution of glycosylated flagellin to evasion of human innate immune responses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 27, p. 19231-19244, 2014.

HIRAMATSU, K. *et al.* The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 10, p. 486-493, 2001.

HOLDEN, M. T. G. *et al.* The genome of Burkholderia cenocepacia J2315, an epidemic pathogen of cystic fibrosis patients. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 1, p. 261-277, 2009.

HSIAO, W. *et al.* IslandPath: aiding detection of genomic islands in prokaryotes. Bioinformatics, v. 19, n. 3, p. 418-420, 2003.

JAIN, R. *et al.* Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. **Molecular biology and evolution**, v. 20, n. 10, p. 1598-1602, 2003.

JAIN, R.; RIVERA, M. C.; LAKE, J. A. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 7, p. 3801-3806, 1999.

JUHAS, M.; CROOK, D. W.; HOOD, D. W. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 12, p. 2377-2386, 2008.

KHALDI, N. *et al.* Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi. **Genome biology**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2008.

KOSKI, L. B.; MORTON, R. A.; GOLDING, G. B. Codon bias and base composition are poor indicators of horizontally transferred genes. **Molecular biology and evolution**, v. 18, n. 3, p. 404-412, 2001.

LANGILLE, M. G. I.; HSIAO, W. W. L.; BRINKMAN, F. S. L. Evaluation of genomic island predictors using a comparative genomics approach. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2008.

LAWRENCE, J. Selfish operons: the evolutionary impact of gene clustering in prokaryotes and eukaryotes. **Current opinion in genetics & development**, v. 9, n. 6, p. 642-648, 1999.

LIANG, D. M.; QIAO, J.J. Phylogenetic analysis of antibiotic glycosyltransferases. **Journal of molecular evolution**, v. 64, n. 3, p. 342-353, 2007.

LU, S. E. *et al.* Occidiofungin, a unique antifungal glycopeptide produced by a strain of Burkholderia contaminans. **Biochemistry**, v. 48, n. 35, p. 8312-8321, 2009.

LUVIZOTTO, D. M. *et al.* Genetic diversity and plant-growth related features of Burkholderia spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1829-1836, 2010.

MARRI, P. R.; GOLDING, G. B. Gene amelioration demonstrated: the journey of nascent genes in bacteria. **Genome**, v. 51, n. 2, p. 164-168, 2008.

MEDRANO-SOTO, A. *et al.* Successful lateral transfer requires codon usage compatibility between foreign genes and recipient genomes. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 10, p. 1884-1894, 2004.

NEVES, A. A. C. Identificação de genes de Burkholderia sp. associados a antagonismo a microrganismos fitopatogênicos. 2011. 62f Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, 2011.

POPTSOVA, M. S.; GOGARTEN, J. P. The power of phylogenetic approaches to detect horizontally transferred genes. **BMC evolutionary biology**, v. 7, n. 1, p. 1-17, 2007.

PUTONTI, C. *et al.* A computational tool for the genomic identification of regions of unusual compositional properties and its utilization in the detection of horizontally transferred sequences. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 10, p. 1863-1868, 2006.

RAGAN, M. A. On surrogate methods for detecting lateral gene transfer. **FEMS Microbiology letters**, v. 201, n. 2, p. 187-191, 2001.

RAVENHALL, M. *et al.* Inferring horizontal gene transfer. **PLoS Comput Biol**, v. 11, n. 5, p. e1004095, 2015.

ROCHA, E. P. C.; TOUCHON, M.; FEIL, E. J. Similar compositional biases are caused by very different mutational effects. **Genome Research**, v. 16, n. 12, p. 1537-1547, 2006.

SHARP, P. M.; LI, W. H. The codon adaptation index-a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. **Nucleic acids research**, v. 15, n. 3, p. 1281-1295, 1987.

SUÁREZ-MORENO, Z. R. *et al.* Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated Burkholderia. **Microbial ecology**, v. 63, n. 2, p. 249-266, 2012.

TSUI, S. **Estudo do cluster n-TASE nas interações ambientais de** *B.* **seminalis TC3.4.2R3**. 2021. 283f. Tese de Doutorado (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São

VIAL, L. *et al.* Burkholderia diversity and versatility: an inventory of the extracellular products. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 1407-1429, 2007.

VIDEIRA, P. A.; GARCIA, A. P.; SÁ-CORREIA, I. Functional and topological analysis of the Burkholderia cenocepacia priming glucosyltransferase BceB, involved in the biosynthesis of the cepacian exopolysaccharide. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 14, p. 5013-5018, 2005.

VOS, M. *et al.* Rates of lateral gene transfer in prokaryotes: high but why?. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 10, p. 598-605, 2015.

WAACK, S. *et al.* Score-based prediction of genomic islands in prokaryotic genomes using hidden Markov models. **BMC bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2006.

WAGNER, A.; DE LA CHAUX, N. Distant horizontal gene transfer is rare for multiple families of prokaryotic insertion sequences. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 280, n. 5, p. 397-408, 2008.

WALTON, J. D. *et al.* Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis. **Fungal genetics and biology**, v. 30, n. 3, p. 167-171, 2000.

WANG, Y. *et al.* Horizontal transfer of genetic determinants for degradation of phenol between the bacteria living in plant and its rhizosphere. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 77, n. 3, p. 733-739, 2007.

WANG, Y. *et al.* Induction of toluene degradation and growth promotion in corn and wheat by horizontal gene transfer within endophytic bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 1051-1057, 2010.

WEINERT, L. A.; WELCH, J. J.; JIGGINS, F. M. Conjugation genes are common throughout the genus Rickettsia and are transmitted horizontally. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1673, p. 3619-3627, 2009.

WOLF, Y. I. *et al.* Genome trees and the tree of life. **TRENDS in Genetics**, v. 18, n. 9, p. 472-479, 2002.

ZANEVELD, J. R.; NEMERGUT, D. R.; KNIGHT, R. Are all horizontal gene transfers created equal? Prospects for mechanism-based studies of HGT patterns. **Microbiology**, v. 154, n. 1, p. 1-15, 2008.

ZHU, B. *et al.* Characterization and inference of gene gain/loss along Burkholderia evolutionary history. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 7, p. EBO. S7510, 2011.

3 MUTAGÊNESE E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DO CLUSTER N-TASE

Resumo

TSUI, S. **Estudo do cluster n-TASE nas interações ambientais de** *B. seminalis* **TC3.4.2R3**. 2021. 283f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Bactérias do complexo Burkholderia cepacia encontram-se em diversos nichos ecológicos, podendo estabelecer interações simbióticas com outros organismos ou causar infecções em pacientes imunocomprometidos. Devido principalmente à altíssima resistência intrínseca a multi-antibióticos, o desenvolvimento de ferramentas genéticas confiáveis para manipular as espécies de Burkholderia é um grande desafio. O entendimento do papel e da influência dos genes nos processos biológicos das células bacterianas e sua interação com outros organismos é de fundamental importância. Nessa etapa do estudo, o principal objetivo foi caracterizar o cluster n-TASE, composto por quatro genes (Bsem_02857, Bsem_02858, Bsem_02859 e Bsem_02860), presente na linhagem B. seminalis TC3.4.2R3. Foram obtidos dois mutantes polares via mutagênese insercional com o plasmídeo pGPΩTp, SST57 com mutação no gene Bseme_02857 e SST28 com mutação no gene Bsem_02858. Com os experimentos realizados no presente estudo, foi observado que existe uma correlação de natureza ainda desconhecida dos genes do n-TASE cluster com motilidade do tipo swarming, produção de biofilme, tolerância ao estresse oxidativo e sobrevivência bacteriana em hemolinfa de G. mellonella, mas não correlacionada à virulência bacteriana a este tipo de modelo de infecção. No atual estudo, foram fornecidas evidências (capítulo 2) de que o cluster n-TASE foi adquirido por meio de um evento de HGT, não foi possível determinar uma correlação entre os genes do cluster com atividade antifúngica e testes relacionados à degradação de poluentes não foram desenvolvidos. Devido aos resultados apresentados, acredita-se que os genes desse cluster estejam relacionados a interação bacteriana de TC3.4.2R3 com o ambiente, visto que processos como motilidade, formação de biofilme tolerância a estresse oxidativo e sobrevivência em G. mellonella foram afetados pela mutagênese dos genes Bsem 02857 e Bsem 02858. Futuramente, serão necessários experimentos para o melhor entendimento da forma como esses genes atuam nesses processos.

Palavras-chave: nocaute gênico, swarming, biofilme, estresse oxidativo, *G. mellonella*

Abstract

TSUI, S. **Study of the n-TASE cluster on environmental interactions of** *B. seminalis* **TC3.4.2R3.** 2021, 283f. PhD thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

The bacteria from Burkholderia cepacia complex are found in several ecological niches and may establish symbiotic interactions with other organisms or cause infections in immunocompromised patients. Mainly due to the extremely high intrinsic multi-drugs resistance, the development of reliable genetic tools to manipulate Burkholderia species is a great challenge. Understanding the role and influence of genes in the biological processes of bacterial cells and their interaction with other organisms is of fundamental importance. In this phase of the study, the main objective was to characterize the n-TASE cluster, composed by four genes (Bsem_02857, Bsem_02858, Bsem_02859 and Bsem_02860), present in the B. seminalis TC3.4.2R3 strain. Two polar mutants were obtained via insertional mutagenesis with plasmid pGP Ω Tp, SST57 with mutation in gene Bsem_02857 and SST28 with mutation in gene Bsem 02858. With the experiments performed in the present study, it was observed that there is a correlation of a unknown nature of the n-TASE cluster genes with swarming motility, biofilm production, oxidative stress tolerance and bacterial survival in G. mellonella hemolymph, but not correlated with bacterial virulence to this type of infection model. In the current study, evidence was provided (Chapter 2) that the n-TASE cluster was acquired through an HGT event, it was not possible to determine a correlation between cluster genes with antifungal activity and tests related to pollutant degradation were not developed. Due to the results presented, it is believed that the genes in this cluster are related to bacterial interaction of TC3.4.2R3 with the environment, as processes such as motility, biofilm formation, oxidative stress tolerance and survival in G. mellonella were affected by mutagenesis of the genes Bsem_02857 and Bsem_02858. In the future, experiments will be needed to better understand how these genes act in these processes.

Key words: gene knockout; swarming; biofilm; oxidative stress; G. mellonella

3.1 Introdução

A manutenção de uma célula viva depende do funcionamento adequado de seus genes. Com o advento do sequenciamento, a quantidade de genomas bacterianos disponíveis aumentou substancialmente, permitindo que novos potenciais genes fossem identificados, sem que a sua função fosse conhecida (SAENZ; DEHIO, 2005; PEREIRA, 2016). O entendimento do papel e da influência dos genes nos processos biológicos das células bacterianas e sua interação com outros organismos é de fundamental importância (CHRISTEN *et al.*, 2011; PETERS *et al.*, 2016) para o estabelecimento de estratégias de controle biológico e entendimento dos mecanismos envolvidos nas interações ecológicas.

O estudo da função gênica pode ser realizado por meio do nocaute gênico, onde a expressão de determinado gene é inativada ou a sua sequência é completamente deletada (WAH-TANG *et al.*, 2015). Em organismos procarióticos, existem diversas tecnologias acessíveis, fáceis de usar e eficientes no estudo de função gênica baseada na modificação do DNA (SUNG *et al.*, 2001; BAE; SCHNEEWIND, 2006; JIANG *et al.*, 2013). As estratégias utilizadas para gerar mutações em genes de interesse variam de acordo com a disponibilidade de recursos, tempo hábil e principalmente organismo de estudo.

Apesar do conhecimento da importância da manipulação genética de bactérias como poderosa ferramenta para o entendimento da função de genes, visando elucidar a fisiologia e patogênese bacteriana no nível molecular. Esse tipo de abordagem genética em bactérias com resistência a múltiplos antibióticos é geralmente mais complicada e torna o progresso do esclarecimento da sua fisiologia e patogênese ainda mais demorado (AUBERT; HAMAD; VALVANO, 2014).

Espécies do complexo Bcc são amplamente distribuídas nos mais diversos ambientes, ocupando diferentes nichos ecológicos, estabelecendo desde interações simbióticas com outros organismos (COMPANT *et al.*, 2008) até infecções em pacientes imunocomprometidos (MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008; VANDAMME; DAWYNDT, 2011). Essas bactérias apresentam resistência intrínseca a multi-antibióticos, dificultando o tratamento de infecções (AARON *et al.*, 2000; NZULA; VANDAMME; GOVAN, 2002). Diversos são os fatores que têm dificultado o desenvolvimento de ferramentas genéticas confiáveis para a manipulação de espécies de *Burkholderia*. Eles incluem a falta de marcadores de seleção e contra-seleção viáveis (selecionáveis), bem como a disponibilidade de poucos métodos confiáveis para introduzir DNA heterólogo em *Burkholderia* (AUBERT; HAMAD; VALVANO, 2014).

No presente estudo, o principal objetivo foi o estudo do papel do cluster n-TASE, composto por quatro genes (Bsem_02857, Bsem_02858, Bsem_02859 e Bsem_02860), presente na linhagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, potencialmente adquirido por transferência horizontal de genes (HGT). Essa linhagem isolada endofiticamente de raízes de cana-de-açúcar, apresenta capacidade de inibir patógenos de cana de açúcar como *Fusarium verticillioides*, solubilizar fosfato, produzir AIA e fixar nitrogênio (LUVIZOTTO *et al.*, 2010).

Em busca da identificação de genes envolvidos no controle de fungos fitopatogênicos (NEVES, 2011) e no controle de sintomas de necrose foliar em orquídeas (MANO, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2016), uma biblioteca de mutantes aleatórios de mini-transposon Tn5 foi analisada. Genes de glicosiltransferase, metiltransferase, proteínas hipotéticas, glutamato sintase, oxidoreductase e proteína de membrana foram associadas à inibição dos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides* e *Ceratocystis paradoxa* e *Phytophthora parasidica* (NEVES, 2011). Foi observado também que o controle biológico da necrose em orquídea está associado à expressão dos genes, fosfolipase semelhante à patatina, glicosiltransferase grupo 1, glutamato sintase, transportadores da MFS (Superfamília Facilitadora Principal), desidrogenases, poli-hidroxialcanoatos (PHAs) (MANO, 2016).

O cluster n-TASE não apresenta homologia correspondente em genomas de referência taxonomicamente próximos de TC3.4.2R3. Acredita-se que o papel desse cluster na sobrevivência, estilo de vida, estabelecimento de associações com outros organismos e até mesmo patogenicidade de TC3.4.2R3 possa ser bastante relevante, visto que estudos anteriores sugerem o seu papel na inibição de fungos. Dessa forma, é importante entender a origem evolutiva desse cluster, bem como o seu papel em interações microbianas de *B. seminalis* TC3.4.2R3 no ambiente.

O mutante gerado por inserção do Tn5, M30, teve o gene Bsem_02858 (metiltransferase) inativado e apresentou atividade de antagonismo defectiva contra o fitopatógeno *F. oxysporum.* Não se tem conhecimento de nenhuma via biossintética responsável pela produção de compostos antifúngicos com alvo específico em *F. oxysporum.* Portanto, a geração de mutantes dos quatro genes que compõem o n-TASE cluster se tornou necessária para a melhor compreensão do papel da metiltransferase (Bsem_02858) na inibição de *Fusarium* spp., bem como o papel dos demais genes em diversas interações que *B. seminalis* TC3.4.2R3 pode estabelecer.

Dessa maneira, os principais objetivos desse estudo foram: (i) geração de mutantes dos genes SST57 (Bsem_02857 - glicosiltransferase) e SST58 (Bsem_02858 - metiltransferase) que compõem o cluster n-TASE por diferentes técnicas de mutagênese; (ii) confirmação e validação dos mutantes SST57 e SST58 por RT-PCR; (iii) caracterização fenotípica dos mutantes por diversas análises comparativas (potencial antagônico contra fungos levedurifomes, fungos fitopatogênicos e bactérias patogênicas; comparação do perfil de LPS - lipopolissacarídeo; produção de biofilme a 28°C e 37°C; tolerância a estresses ambientais - oxidativo, salino, ácido, e a detergente; motilidade bacteriana; produção de AHL; produção de toxoflavina; resistência a antibióticos; atividade antimicrobiana contra *B. gladioli* ORQF-04F e virulência contra *Galleria mellonella*).

Com base em resultados anteriores (NEVES, 2011), esperava-se observar alteração dos fenótipos de SST57 e SST58 quanto ao perfil de inibição de fungos do gênero *Fusarium*. No entanto, os resultados mostraram uma divergência com a hipótese inicialmente apresentada, pois nenhuma diferença foi observada entre a linhagem selvagem e mutantes quanto à atividade antagônica contra *Fusarium* spp. e outras espécies de fungos. Os resultados obtidos na presente etapa mostraram que existe uma correlação de natureza ainda desconhecida dos genes do n-TASE cluster com motilidade do tipo swarming, produção de biofilme, tolerância ao estresse oxidativo e sobrevivência bacteriana em hemolinfa de *G. mellonella*.

3.2 Materiais e Métodos

Parte das análises descritas no presente trabalho foram realizadas no Wellcome-Wolfson Institute for Experimental Medicine, Queen's University of Belfast (Proc. BEPE 2018/04397-6), Belfast, Irlanda do Norte, Reino Unido, sob supervisão do Prof. Dr. Miguel Valvano.

<u>3.2.1 Linhagens bacterianas e condições utilizadas</u>

As linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados para a construção de mutantes no presente estudo estão listados na Tabela 3.1. As linhagens de *B. seminalis* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (Sigma Chemical) ou *Tryptic soy broth* - TSB (BD) e meio SOB - *Super Optimal Broth* (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM e MgSO₄ 10 mM). Para crescimento e procedimentos de transformação bacteriana, *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi incubada a 28°C ou 30°C. Quando necessário, os antibióticos canamicina (300 µg/mL), cloranfenicol (60 µg/mL), espectinomicina (300 µg/mL), trimetoprima (100 µg/mL), tetraciclina (100 µg/mL), gentamicina (15 µg/mL) foram adicionados ao meio de cultura. Também foi feita adição de L-ramnose, glicose na concentração final de 0,5% (m/v) e L-arabinose (10 mM) conforme requerido. Os mutantes SST57 e SST58 foram cultivados sempre em meio de cultura suplementado com o antibiótico trimetoprima (100 µg/mL).

Os fungos leveduriformes *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* foram cultivados em meio Sabouraud - SD (MERCK). As bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* foram cultivadas em meio LB a 37°C. *Burkholderia gladioli* foi cultivada a 28°C em meio *Tryptic soy broth* - TSB (BD).

Linhagem/plasmídeo	Características relevantes	Fonte e/ou referência
Escherichia coli		
DH10B	F- mcrA Δ(mrr-horasdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK λ- rpsL(StrR) nupG	Estoque do laboratório do Prof. Gabriel Padilla Maldonado
DH5a	F ⁻ , φ80 lacZΔM15 (ΔlacZYA-argF)U169 endA1 recA1 horasdR17(rK ⁻ mK ⁺) supE44 thi-1 ΔqyrA96 relA1	Estoque do laboratório do Prof. Miguel Valvano
SY327	araD, Δ (lac pro) argE(Am) recA56 rif ^R nalA λ pir	Estoque do laboratório do Prof. Miguel Valvano

Tabela 3.1 - Linhagens bacterianas e plasmíde
--

GT115	F ⁻ , mcrA Δ(mrr horasdRMS-mcrBC) φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 rspL (StrA) endA1 Δdcm uidA(ΔMlul)::pir-116 ΔsbcC-sbcD	Estoque do laboratório do Prof. Miguel Valvano
Burkholderia seminalis		
TC3.4.2R3	Isolado endofítico de cana-de-açúcar, atividade	Araújo <i>et al</i> . (2016)
∆2858	TC3.4.2R3 com integração do plamídeo pDel2858,	Presente estudo
∆5760	TC3.4.2R3 com integração do plasmídeo pDel5760. Tmp ^R	Presente estudo
Cond-2858 SST57 SST58	TC3.4.2R3, <i>Bsem_02858</i> ::pSC200, Tmp ^R TC3.4.2R3, <i>Bsem_02857</i> ::pSST57, Tmp ^R TC3.4.2R3, <i>Bsem_02858</i> ::pSST58, Tmp ^R	Presente estudo Presente estudo Presente estudo
TC3.4.2R3::pCas	Mutante de TC3.4.2R2 com integração de plasmídeo pCas	Presente estudo
LMG 19587	Isolado de sementes de <i>Oryza sativa</i> (arroz) em Jala-jala Rizal Província de Filipinas	BCCM/LMG ^c , Vanlaere <i>et al.</i> (2008)
LMG 24067	Isolado de paciente de fibrose cística nos Estados Unidos	BCCM/LMG ^c , Vanlaere et al. (2008)
LMG 24271	Isolado de sementes de <i>Oryza sativa</i> (arroz) em Jala iala Rizal Província de Filipinas	BCCM/LMG ^c , Vanlaere <i>et</i>
LMG 24272	Isolado de paciente com infecção nosocomial na Tailândia	BCCM/LMG ^c , Vanlaere <i>et</i>
LMG 24273	Isolado de cana-de-açúcar na Índia	BCCM/LMG ^c , Vanlaere <i>et al.</i> (2008)
Burkholderia cenocepacia		
K56-2	ET12 clone de J2315, isolado clínico de fibrose cística	BCRRC ^ь ; Darling <i>et al</i> . (1998) Estoque do laboratório do Prof. Miguel Valvano
H111	Isolado clínico de fibrose cística	Geisenberger <i>et al.</i> (2000) Estoque do laboratório do Prof. Leo Eberl
Plasmídeos		
pEx18Km	ori⊤+, Km ^R , sacB ⁺ , vetor suicida com resistência canamicina	Choi e Schweizer (2005)
pEx_Bs2858	Plasmídeo pEx18Km gerado pela técnica In-Fusion cloning para mutagênese do gene Bsem, 02858	Presente estudo
pSF	Plasmídeo com base em pBBR32, com resistência a cloranfenicol, gene da Cas9 e sequência N20	Presente estudo; Oxford Genetics
pCas	repA101(Ts) kan Pcas-cas9 ParaB-Red laclq Ptrc-	Jiang <i>et al</i> . (2015)
pTargetF pTarget_MTF	pMB1 aadA Vetor pTargetF contendo sequência N ₂₀ alvo no	Jiang <i>et al</i> . (2015) Presente estudo
pGPI-Scel	ori _{R6K} , Tmp ^R , mob ⁺ , carrega o sítio de	Flannagan <i>et al</i> . (2008)
pDAI-SceI-SacB	ori _{pBBR1} , Tet ^R , mob ⁺ , P _{dhfr} , epítopo FLAG, gene I- Scel, gene SacB	Hamad <i>et al.</i> (2012)
pRK2013 pQIB9	ori _{colE1} , RK2 derivativo, Km ^R , mob ⁺ , tra ⁺ pGPI-Scel com fragmentos flanqueando o gene <i>PqiB</i> em K56-2, Tmp ^R	Figurski e Helinski (1979) Amy Sterling
pDel2858	pGPI-Scel com fragmentos flanqueando o gene <i>Bsem_</i> 02858, Tmp ^R	Presente estudo
--------------	--	---------------------------------
pDel5760	pGPI-Scel com fragmentos flanqueando o cluster de quatro genes. Tmp ^R	Presente estudo
pSC200	ori _{R6K} , mob ⁺ , <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , <i>P_{rhaB}</i> , Tmp ^R	Ortega <i>et al.</i> (2007)
pSC200-MTase	pSC200, fragmento abrangendo 342 bp no terminal 5' do gene <i>Bsem_02858</i> , Tmp ^R	Presente estudo
pGPΩTp	ori _{R6K} , mob ⁺ , Tmp ^R	Flannagan <i>et al</i> . (2007)
pSST57	pGPΩTp, 273 bp contendo fragmento interno de <i>Bsem_02857</i> , Tmp ^R	Presente estudo
pSST58	pGPΩTp, 221 bp internal fragment from Bsem 02858, Tmp ^R	Presente estudo
pDA17	ori _{pBBR1} , Tet ^R , mob ⁺ , P _{dhfr} , epítopo FLAG	Aubert <i>et al</i> . (2008)
pDA181	ori _{pBBR1} , Tet ^R , mob ⁺ , <i>P</i> _{dhfr} , epítopo 6X HIS	Aubert et al. (2008)

^a Km^R, resistência ao antibiótico canamicina; Tmp^R, resistência ao antibiótico trimetoprima; Tet^R, resistência ao antibiótico tetraciclina

^b BCRRC, B. cepacia Research and Referral Repository for Canadian CF Clinics

^c BCCM/LMG, Belgian Co-ordinated collections of micro-organisms

3.2.2 Geração de células competentes

3.2.2.1 Escherichia coli

Culturas eletrocompetentes das diversas linhagens de *E. coli* utilizadas no presente estudo (Tabela 3.1) foram obtidas pelo inóculo de uma colônia pura em 5 mL de meio de cultura SOB, incubado sob agitação constante de 200 rpm a 37°C por 18 horas. Após incubação, o pré-inoculo foi utilizado para o inóculo de 100 mL com densidade óptica (D.O._{600nm}) inicial de 0,1 medida em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 Amersham Pharmacia Biotech). O inóculo bacteriano foi incubado sob agitação constante de 200 rpm a 37°C até atingir a D.O._{600nm} final de 0,6 a 0,8.

O volume da cultura bacteriana foi dividido em dois frascos de 50 mL e centrifugado a 1.900xg por 10 minutos a 4°C, posteriormente, o sobrenadante foi descartado, o pellet bacteriano foi lavado e centrifugado duas vezes nas mesmas condições com 50 mL de água deionizada autoclavada gelada. A última lavagem do pellet foi realizada com glicerol 10% gelado, seguida de centrifugação, nas mesmas condições.

O sobrenadante foi descartado e o restante de glicerol 10% foi utilizado para ressuspender as células competentes. Foram adicinonados 2 µL da célula competente em 1 mL de glicerol 10% e a densidade óptica foi verificada, devendo atingir D.O._{600nm} = 0,15 para diluição de 500x. Foram aliquotados 100 μL da célula competente em microtubos, congelados em nitrogênio líquido e finalmente estocados a -80°C para posterior utilização.

Alguns procedimentos de transformação foram realizados por choquetérmico ao invés de eletroporação, nesse caso foram geradas células cálciocompetentes das linhagens de *E. coli* (principalmente GT115) de acordo com a metodologia descrita por Chang *et al.* (2017). Os procedimentos para o crescimento bacteriano foram os mesmos descritos acima na geração de células eletrocompetentes. A D.O._{600nm} ideal da cultura bacteriana para iniciar as lavagens foi de 0,4. Os frascos contendo 50 mL de cultura nessa D.O. foram incubados no gelo por 20 min, posteriormente, foram centrifugados a 1.900xg por 10 min a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspendido com 20 mL de solução CaCl₂, 0,1M e incubado por 30 min no gelo. Seguido de centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o pellet dos dois frascos foi reunido em 5 mL de solução CaCl₂0,1M com glicerol 15%. Foram preparadas alíquotas de 50 μL e estocadas a -80°C para posterior utilização.

3.2.2.2 B. seminalis TC3.4.2R3

A geração de células eletrocompetentes da linhagem TC3.4.2R3 também foi necessária e para isso, o método descrito por Choi; Kumar e Schweizer (2006) para células competentes de *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizado. Uma colônia bacteriana de TC3.4.2R3 foi inoculada em 10 mL de meio SOB, incubada a 28°C por 18 horas sob agitação constante de 200 rpm. Após a incubação, 1,5 mL da cultura bacteriana foi aliquotada em um microtubo e centrifugado a 16.000xg por 2 min (T.A. - temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspendido em 1 mL de solução de sacarose 300 mM (T.A.). O processo foi repetido três vezes e o pellet de 4 microtubos (total de 6 mL de cultura bacteriana) foi juntado em 100 μL de sacarose 300 mM, duas alíquotas de 50 μL foram preparadas para utilização subsquente. Nesse protocolo, não é recomendado o preparo prévio e estocagem de células eletrocompetentes de TC3.4.2R3.

Também foi feita a geração de células cálcio-competentes de TC3.4.2R3 para procedimentos-testes de transformação por choque térmico. O protocolo descrito por Chuanchuen; Narasaki e Schweizer, (2002) para *P. aeruginosa* foi utilizado. Uma cultura de 5 mL de TC3.4.2R3 em meio SOB foi crescida nas mesmas condições descritas acima para a geração de TC3.4.2R3 eletrocompeteente. Foi utilizado 1 mL da cultura bacteriana em microtubos gelados para centrifugação rápida de 30 segundos a 16.000xg). O sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspendido em 1mL de soluçao MgCl₂0,1M (gelada). Novamente os tubos foram centrifugados nas mesmas condições (T.A.), e o pellet foi ressupendido em 1 mL da solução de sais TG (CaCl₂ 75 mM; MgCl₂ 6 mM e 15% glicerol). Os tubos foram incubados no gelo por 10 min, seguido de centrifugação nas mesmas condições, após remoção do sobrenadante o pellet foi ressuspendido em 200 µL da solução de sais TG e congelado a -80°C até sua utilização.

3.2.3 Métodos de recombinação de DNA

Procedimentos de manipulação do DNA, tais como ligação, digestão com enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose foram realizadas de acordo

147

com técnicas convencionais (SAMBROOK *et al.*, 1989). As enzimas de restrição (*Ndel, Xbal, Hind*III, *Bam*HI, *Eco*RI, etc), OneTaq DNA polimerase, Q5 DNA polimerase, T4 Polynucleotide Kinase, Antarctic Phosphatase e a T4 DNA-ligase foram adquiridas da New England Biolabs (Massachusetts, Estados Unidos). A enzima TaKaRa Ex Taq DNA Polymerase foi adquirida da Sinapse Biotecnologia, representante da Takara Bio USA, Inc. (Califórnia, Estados Unidos). Os procedimentos de extração de DNA, extração de plasmídeo, purificação de produto de PCR e procedimentos de purifição de banda de gel de agarose foram todos realizados com kits moleculares da QIAGEN (Hilden, Alemanha) e PROMEGA (Wisconsin, Estados Unidos).

As PCRs foram realizadas usando o Termociclador C1000 Touch [™] (BioRad, Califórnia, Estados Unidos) ou VERITI 96-WELL THERMAL CYCLER, 0.2ML (Applied Biosystems). Os amplicons para clonagem foram obtidos com OneTaq® Polymerase (NEB), Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) e TaKaRa Ex Taq® DNA Polymerase (Takara Bio), dependendo da finalidade e disponibilidade. As PCRs de colônia foram realizadas com a GoTaq® polimerase (PROMEGA, Wisconsin, Estados Unidos), de acordo com as recomendações do fabricante, e otimizadas para cada par de primers. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose a 0,8% -1,0% (m/v), fotodocumentados e as bandas foram purificadas com o kit de extração e purificação de banda de gel QIAquick (QIAGEN) ou illustra[™] GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, quando necessário.

3.2.4 Procedimentos para inserção de DNA em bactéria

A maioria dos experimentos de transformação de DNA em *E. coli* foram realizados pelo método do cloreto de cálcio (COHEN *et al.*, 1972), após transformação as células foram incubadas a 37°C (*E. coli*) ou 28°C (*Burkholderia*); sem agitação, por 3 horas.

O procedimento de eletrotransformação bacteriana (DOWER; MILLER; RAGSDALE, 1988), quando necessário foi realizado em volume de 2-10 µL de plasmídeo [30-100 ng] ou reação de transformação (por exemplo no sistema In-Fusion cloning) foram adicionados 50 ou 100 µL de célula competente. O conjunto foi transferido para uma cubeta de eletroportação (Genepulser 2,0), previamente resfriada em gelo, posteriormente a transformação foi feita em capacitor (25µF, 1.3 kV) e resistor (400Ω) da (Genepulser, Bio-Rad). As células transformadas foram recuperadas com 1 mL de meio SOC ou SOB incubadas a 37°C (*E.coli*) ou 28°C (*Burkholderia*); sob agitação constante, por 1 hora. Em seguida, o conteúdo foi semeado em meio LBA (LB com adição de ágar) suplementado com antibiótico correspondente ao vetor de transformação utilizado (por exemplo, no caso de pEx18Km, o meio de cultura foi suplementado com canamicina).

A imobilização de plasmídeos em *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi conduzida por conjugação triparental (CRAIG *et al.*, 1989) (Figura 3.1) utilizando o plasmídeo auxiliar (*helper*) pRK2013 (Tabela 3.1).

Figura 3.1 - Representação esquemática do procedimento de conjugação triparental realizada com *B. seminalis* TC3.4.2R3 para transferência de plasmídeos. Este protocolo foi baseado em Aubert *et al.* (2014) com modificações. Tm 100, trimetoprima a 100 µg/mL; Gm 15, gentamicina a 15 µg/mL



FONTE: Tsui (2021)

3.2.5 Teste de resistência a antibióticos

Os antibióticos ampicilina, gentamicina, trimetoprima, polimixina B, canamicina, cloranfenicol e tetraciclina foram utilizados para avaliar a resistência a antibióticos de TC3.4.2R3 em duplicata nas seguintes concentrações: 0 (sem adição do antibiótico), 10, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL. O meio MHA (Mueller-Hinton-

Agar, caseína hidrolisada - 17,5 g; extrato de carne - 2,0 g; amido - 1,5 g, ágar - 17 g e dH2O até completar 1 litro) foi suplementado com as concentrações dos antibióticos a serem testados em *B. seminalis* TC3.4.2R3.

O meio MHA foi utilizado para realizar o teste de susceptibilidade de antibióticos, pois trata-se de um meio de cultura com substancial fonte de proteínas e carboidratos que proporcionariam o desenvolvimento e crescimento de diversas linhagens bacterianas, inclusive as de interesse clínico. Além disso, a baixa concentração de timina e timidina e níveis adequados de cálcio e magnésio evitam falsos resultados de sensibilidade ou resistência (PHILLIPS *et al.*,1991). As culturas foram incubadas a 28°C por 5 dias para avaliar se não ocorre crescimento tardio, o qual poderia influenciar os resultados.

3.2.6 Métodos de obtenção de mutantes de B. seminalis TC3.4.2R3

3.2.6.1 Splicing by overlapping extension (SOEing) PCR

3.2.6.1.1 Desenho de primers

A metodologia utilizada por Choi e Schweizer (2005) em *P. aeruginosa* foi adaptada para geração de mutantes dos genes que compõem o cluster n-TASE em *B. seminalis* TC3.4.2R3. A metodologia se baseia no SOEing PCR (*Splicing by overlapping extension*) descrita inicialmente por Horton *et al.* (2013). Vários *rounds* de PCRs são realizados para obtenção de sequências que flanqueiam o gene a ser mutado (a montante e a jusante). Além disso um gene de resistência a antibiótico é inserido entre essas regiões (originando o cassete de mutação) para que a troca alélica ocorra com o gene alvo da mutação. O mutante pode ser selecionado por resistência ao antibiótico inserido. Para essa metodologia, a linhagem bacteriana de estudo não deve apresentar resistência intrínseca ao antibiótico utilizado para construção do cassete de mutação.

Foram desenhados seis pares de primers (Tabela 3.2) para cada um dos genes que compõem o n-TASE cluster, sendo que o nome dos primers listados foram enumerados de 01-06 precedido pela sigla MTase, GTF, PH1 e PH2, para os genes de metiltransferase (Bsem_02858), glicosiltransferase (Bsem_02857) e proteínas hipotéticas (Bsem_02859 e Bsem_02860), respectivamente. Todas as descrições para o desenho de primers bem como a representação da posição dos primers, sequências *upstream* e *downstream* foram feitas utilizando como exemplo o gene da metiltransferase (Figura 3.2).

A sequência a montante (*upstream*) do gene é composta por 900 pb antes do seu *start codon* adicionada de 100 pb após o *start codon* e a sequência a jusante (*downstream*) do gene é composta por 100 pb antes do *stop codon* juntamente a 900 pb após *stop codon* (gene adjacente) (Figura 3.2). O programa OligoPerfect[™] Designer (disponível em: http://goo.gl/2nrzy2) foi utilizado para realizar o desenho de primers. A sequência do gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol (906 pb) foi obtida do banco de dados de vetores Addgene (disponível em: https://www.addgene.org/browse/sequence_vdb/1857/). Foi realizada uma edição manual na sequência dos primers para o acréscimo de sequências de reconhecimento de enzimas de restrição. Os primers MTase_02 e MTase_03, bem como MTase_04 e MTase_05, apresentam de 18-20 nucleotídeos (regiões de sobreposição estão representadas por um traço mais forte sobre a seta que representa o primers na figura 3.2).

Figura 3.2 - Representação esquemática do local de anelamento dos primers para obtenção dos fragmentos *up* e *downstream* do gene Bsem_02858, bem como procedimentos subsequentes (PCRs, digestão de cassete de mutagênese e pEX18Km, ligação para geração do vetor de mutagênese)



Os primers MTase01 e MTase06 devem apresentar sítios de restrição não existentes no fragmento de DNA alvo, porém presentes no MSC (múltiplo sítio de clonagem) do plasmídeo pEx18Km (*Xbal* e *Hind*III). Além disso, os primers MTase01 e MTase06 devem conter 4-6 nucleotídos na posição *upstream* do sítio de restrição para permitir uma digestão efetiva dos produtos de PCR. A seleção dos sítios de reconhecimento de enzimas de restrição foi realizada com o auxílo da ferramenta NEBcutter v2.0 da página New England BioLabs Inc. (disponível em: http://nc2.neb.com/NEBcutter2/), assim, o sítio foi escolhido de acordo com a ausência de sua sequência na região gênica de interesse a ser manipulada

geneticamente. Após edição manual dos primers desenhados e selecionados, uma confirmação de presença de dímeros foi realizada com auxílio da ferramenta Multiple Primer Analyzer, sendo que o número máximo de dímeros toleráveis foi 3.

Tabela 3.2 - Lista de primers desenhados para SOEing PCR dos genes do n-TASE cluster. Primers MTase01-06 sintetizados para mutagênes do gene de metiltransferase (Bsem_02858), GTF01-06 para o gene de glicosiltrransferase (Bsem_0287); PH1.01-06 para o gene Bsem_02859 e PH2.01-06 para o Bsem_02860 em *B. seminalis* TC3.4.2R3 via SOEing PCR

Nome do	Sequência (5' → 3') ª,b	Enzima	Ta (°C)
primer		de	
		restrição*	
MTase01	CCGCG <u>TCTAGA</u> GCGACGATCGACGTAGCAC	Xbal	64
MTase02	CAACAGGGACACCAGGATTTCATGAGGCGTCTCACGAT	N/A	
MTase03	ATCGTGAGACGCCTCATGAAATCCTGGTGTCCCTGTTG	N/A	62
MTase04	GGAGACGAACGCGATGAA TCTGCCATTCATCCGCTTATT	N/A	
MTase05	AATAAGCGGATGAATGGCAGATTCATCGCGTTCGTCTCC	N/A	65
MTase06	CGGCC <u>AAGCTT</u> GTGATCAGTGCGGGTGTTT	HindIII	
GTF01	CCGCG <u>TCTAGA</u> TGCGAGTACATCCTGTCGTC	Xbal	68
GTF02	CAACAGGGACACCAGGATTTGTAAATTCACCCCCAAGCTG	N/A	
GTF03	CAGCTTGGGGGTGAATTTAC AAATCCTGGTGTCCCTGTTG	N/A	62
GTF04	GTTTGCATCTGCTTGACCGCTGCCATTCATCCGCTTATT	N/A	
GTF05	AATAAGCGGATGAATGGCAGCGGTCAAGCAGATGCAAAC	N/A	64
GTF06	CGGCC <u>AAGCTT</u> GTCTTGATGGCCCAGGTGT	HindIII	
PH1.01	CCGCG <u>TCTAGA</u> GGCTGCGTTTCATCTACTTCT	Xbal	64
PH1.02	CAACAGGGACACCAGGATTTCAACGAACAGGGTACCGAAC	N/A	
PH1.03	GTTCGGTACCCTGTTCGTTGAAATCCTGGTGTCCCTGTTG	N/A	62
PH1.04	AATCGCGGTGATGAGGTC CTGCCATTCATCCGCTTATT	N/A	
PH1.05	AATAAGCGGATGAATGGCAGGACCTCATCACCGCGATT	N/A	64
PH1.06	CGGCC <u>AAGCTT</u> GCATCCCATAACCACAGGAG	HindIII	
PH2.01	CCGCG <u>TCTAGA</u> CGACACGGTAGTGAAGTTCG	Xbal	65
PH2.02	CAACAGGGACACCAGGATTTCGTAGACCACGACGACCAC	N/A	
PH2.03	GTGGTCGTCGTGGTCTACGAAATCCTGGTGTCCCTGTTG	N/A	62
PH2.04	TGTTGACCACTGCAGCGTACTGCCATTCATCCGCTTATT	N/A	
PH2.05	AATAAGCGGATGAATGGCAGTACGCTGCAGTGGTCAACA	N/A	66
PH2.06	CGGCC <u>AAGCTT</u> GACGCTCGAGAAGGCAAC	HindIII	

^aSítios de reconhecimento de enzimas de restrição incorporados na sequência de primers estão sublinhados

^b Regiões de sobreposição estão em negrito

Ta, temperatura de anelamento utilizada para PCR

3.2.6.1.2 PCR para geração de fragmentos e cassete de mutação

Os produtos de PCR para a construção do cassete de mutagênese foram obtidos a partir de PCR com o DNA genômico de TC3.4.2R3 para os fragmentos *upstream* e *downstream* de cada um dos genes do cluster (primers 01-02 para *upstream* e 05-06 para *downstream*). O gene de resistência ao cloranfenicol foi obtido por PCR a partir do plasmídeo pBC, com os respectivos pares de primers (03 e 04) desenhados para cada um dos genes do cluster. A enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase foi utilizada nesse primeiro *round* de PCRs. As reações de PCR foram conduzidas seguindo as recomendações do fabricante, nas seguintes condições: desnaturação a 98°C por 30 seg, 35 ciclos de 98°C por 10 seg; temperatura de anelamento (Ta) correspondente ao par de primers (Tabela 3.2) por 30 seg; 72°C por 2 min, seguida de extensão final de 72°C por 2 min.

Os amplicons foram purificados do gel de agarose (QIAquick® Gel Extraction - QIAGEN), a concentração foi ajustada para 100 ng/µL com auxílio de nanodrop (NanoDrop 2000/2000c UV-Vis) e centrífuga concentradora (Eppendorf Concentrator plus). Posteriormente, estocados em freezer -20°C para análises futuras.

O 2° round de PCRs para junção dos fragmentos (*upstream*, cloranfenicol e *downstream*) formando o cassete de mutagênese (Figura 3.2) para cada um dos genes foi conduzido utilizando os primers 01 e 06 desenhados para cada gene, por exemplo primers MTase01 e MTase06, para Bsem_02858 (Tabela 3.2). A enzima TaKaRa ExTaq DNA polimerase foi utilizada para essa PCR de junção dos fragmentos, seguindo as recomendações do fabricante: 10 µL de 10 x Ex Taq Buffer; 2 µL de dNTP [10 mM]; 2 µL de cada primer [10 µM] - adicionados apenas após a etapa de pré-tratamento; 1 µL de cada fragmento (*upstream*, cloranfenicol e *downstream*) purificado [100 ng/µL]; 0,5 µL de ExTaq Polimerase, H₂O Milli-Q para completar o volume final de 100 µL.

Uma etapa importante para realizar a junção dos fragmentos foi o prétratamento das reações contendo todos os reagentes para a PCR com exceção dos primers, constitui de uma desnaturação inicial de 2 minutos a 94° C, seguido de 3 ciclos de 30 segundos a 94° C; um ciclo de 30 segundos a 55° C e 30 segundos a 68°C. Após esse pré-tratamento, os primers foram adicionados nos volumes descritos acima e a reação foi realizada com um ciclo de 2 minutos a 68°C, seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 56°C e 5 minutos a 68°C e uma extensão final de 10 minutos a 68°C em termociclador. O produto das reações foi analisado em gel de agarose, purificado, quantificado em nanodrop e estocado em freezer -20°C para análises futuras.

Os cassetes de mutagênese obtidos por meio de SOEing PCR e o vetor pEx18Km foram duplamente digeridos com a enzimas *Xba*I e *Hind*III (NEB), conforme indicações do fabricante.

3.2.6.2 In-Fusion Cloning

A etapa de obtenção do cassete de mutagênese por SOEing PCR não foi atingida com êxito. Embora diversas tenham sido as tentativas, a junção dos fragmentos *upstream*, cloranfenicol e *downstream* para os genes Bsem_02857 e Bsem_02858 não ocorreu. Sendo ambos, os únicos genes com predição da função gênica conhecida, já que Bsem_02859 e Bsem_02860 são proteínas hipotéticas. A fim de acelerar o processo de obtenção do vetor para mutagênese foi testada a metodologia de mutagênese pelo sistema In-Fusion® HD Cloning (Takara Bio USA, Inc.). Trata-se de um kit comercial que promete a junção rápida e eficiente de fragmentos de DNA em qualquer vetor de clonagem, sendo necessários insertos gerados por PCR e vetor linearizado por digestão com enzimas de restrição (Figura 3.3).

Figura 3.3 - Representação esquemática da utilização do sistema In-Fusion cloning para mutagênse do gene Bsem_02858. Posição dos primers, com destaque na sequência de sobreposição para junção dos fragmentos que compõem o cassete de mutagênese



FONTE: Tsui (2021)

Primers específicos para o sistema In-Fusion® HD Cloning para mutagênese do gene Bsem_02858 foram desenhados no site da Clontech (disponível em: http://www.clontech.com/US/Products/Cloning and Competent Cells/Cloning R esources/Online In-Fusion Tools). Os primers desenhados para obtenção dos fragmentos de DNA devem apresentar na extremidade 5' um sítio de sobreposição composto por 15 pb com a sequência do vetor a ser utilizado (Tabela 3.3).

Os produtos de PCR para a construção do vetor de mutagênese foram obtidos a partir de PCR com o DNA genômico de TC3.4.2R3 para os fragmentos *upstream* e *downstream* de Bsem_02858. O gene de resistência ao cloranfenicol foi obtido por PCR a partir do plasmídeo pBC, com primers MTASE03_CAT_F e MTASE04_CAT_R (Tabela 3.3). A enzima PFU DNA Polimerase (Sinapse Inc) foi utilizada para as PCRs, seguindo recomendações do fabricante nas seguintes

condiões: desnaturação inicial de 3 minutos a 98° C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 98° C; 30 segundos a 68° C; 2 minutos e 30 segundos a 72° C e uma extensão final de 10 minutos a 72° C em termociclador.

Tabela 3.3 - Primers desenhados para mutagênese do gene da metiltransferase, Bsem_02858, em *B. seminalis* TC3.4.2R3 via sistema In-Fusion cloning

Nome do primer	Sequência (5′ → 3′)ª	Ta (°C)
MTASE01_UP_F	ACGACGGCCAGTGCCAAGCT TGCGACGATCGACGTAGCACG	64
MTASE02_UP_R	ACCAGGATTTC ATGAGGCGTCTCACGATCGG	_
MTASE03_CAT_F	CTCATGCGAGAAATCCTGGT GTCCCTGTTG	66
MTASE04_CAT_R	GCGATGAATGCTGCCATTCA TCCGCTTATTATCAC	
MTASE05_DN_F	TGAATGGCAGCATTCATCGCGTTCGTCTCCACG	66
MTASE06_DN_R	GGTACCCGGGGATCCTCTA GATCGAGTGTCGCGCATGCG	

^aRegiões de sobreposição estão em negrito

Ta, temperatura de anelamento utilizada para PCR

Os produtos de PCR foram purificados do gel de agarose, a quantificação foi feita em nanodrop e estocados em freezer -20°C para análises futuras. A reação de fusão dos fragmentos de DNA (*upstream*, cloranfenicol e *downstream* de Bsem_02858) com o vetor pEx18Km linearizado pela dupla digestão (Figura 3.3) com as enzimas *Xbal* e *Hind*III foi realizada seguindo as recomendações do fabricante, com volume final de 10 µL, sendo 2 µL de In-Fusion HD Enzyme Premix, 50 ng de cada fragmento de DNA purificado e gerado por PCR e 150 ng do vetor pEx18Km. A reação foi incubada a 50°C por 15 min, posteriormente, foi colocada no gelo. Células cálcio competentes de *E. coli* DH10B foram transformadas com 2,5 µL da reação In-Fusion (item 3.2.6). As células transformantes após incubação por 1 hora a 37°C foram semeadas em meio de cultura LBA contendo canamicina (300 µg/mL) e cloranfenicol (60 µg/mL).

3.2.6.3 CRISPR/Cas9

3.2.6.3.1 Vetor all-in-one pSF

A metodologia do sistema CRISPR/Cas9 foi testada primeiramente com o gene da metiltransferase (Bsem_02858) por meio do vetor *all-in-one* pSF-OXB20-Cas9wt-OXB20-gRNA-Bsem-02858 (abreviado para pSF - Tabela 3.1) confecionado pela Oxford Genetics (Figura 3.4). O vetor de 8.699 pb é composto por um promotor OXB20 tanto para a proteína Cas9 quanto para os gRNAs específicos para o gene alvo da metiltransferase (Bsem_02858) e o gene para resistência ao antibiótico cloranfenicol (CmR) foi utilizado para a seleção de transformantes TC3.4.2R3::pSF.

Figura 3.4 - Representação esquemática do vetor pSF sintetizado pela empresa Oxford Genetics, compostos por duas gRNAs com alvo em Bsem_02858, uma mais próxima a extremidade 5' do gene e outra mais próxima da extremidade 3', responsáveis por remover a parte principal do gene Bsem_02858, induzindo duas DSBs (*double strand breaks*) na sequência. O mecanismo de reparo de DNA de TC3.4.2R3 seria responsável pela junção das estremidades (via NHEJ) e então geração do mutante de TC3.4.2R3 com deleção do Bsem_02858, ΔBsem_02858



FONTE: Tsui (2021)

A eletrotransformação foi utilizada para a inserção do vetor *all-in-one* pSF em células de *B. seminalis* TC3.4.2R3 eletrocompetentes. A obtenção de células competentes de *B. seminalis* TC3.4.2R3 pelo método rotineiro para *E. coli* (DOWER;

MILLER; RAGSDALE, 1988) foi comparada com as metodologias específicas para *P. aeruginosa* (CHOI; KUMAR; SCHWEIZER, 2006) e *Burkholderia glumae* (SAITOH; TERAUCHI, 2013) a fim de se obter células eletrocompetentes de *B. seminalis* TC3.4.2R3 que resultassem em maior eficiência de transformação.

Além disso, um controle positivo, utilizando células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α, foi feito para comparar a eficácia no método de eletroporação para a inserção do vetor *all-in-one* do sistema CRISPR/Cas9.

Alíquotas de 100 µL de células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α e *B. seminalis* TC3.4.2R3 foram misturados com 2 µL do vetor pSF [100ng/µL] em uma cubeta de 2,0 mm. O sistema de eletroporação Gene Pulser Xcell[™] foi utilizado para a eletrotransformação de células bacterianas (pulso de 2,5 kΩ). Para proporcionar uma maior fidelidade do procedimento de transformação, 2 µL de água Milli-Q foram transformados com 100 µL de células *B. seminalis* TC3.4.2R3 nas mesmas condições, para servir como controle negativo. As células transformantes foram semeadas em meio de cultura LBA suplementado com cloranfenicol (100µg/mL).

Após incubação, algumas UFCs (unidades formadoras de colônias) transformadas de *E. coli* DH5α foram selecionadas para realizar uma extração de plasmídeo seguida de PCR utilizando o par de primers MTase03 e MTase04 (Tabela 3.2), que anelam no gene de resistência ao cloranfenicol.

Após 48 horas de incubação a 28°C e 37°C, as placas foram avaliadas quanto à eficiência de transformação, por meio da contagem das UFCs, considerando 1 µg de vetor em um determinado volume de células competentes (100 µL). Foram coletadas de forma aleatória, 14 colônias para confirmação da mutação por PCR utilizando os primers MTase01 e MTase06 (Tabela 3.2) e a enzima Easy Taq® Polimerase (Transgen Biotech), seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizadas as seguintes condições em termociclador: desnaturação inicial de 5 minutos a 94° C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94° C; 30 segundos a 72° C; 5 minutos a 72° C e uma extensão final de 10 minutos a 72° C. O produto das reações foi analisado em gel de agarose juntamente com o marcador de peso molecular 1Kb.

3.2.6.3.1.1 Avaliação de células eletrocompetentes

A fim de avaliar a viabilidade das células eletrocompetentes *B. seminalis* TC3.4.2R3, foi realizada uma transformação com as mesmas células eletrocompetentes utilizadas com o vetor pSF, com o vetor pBBR1MCS de 4.707 pb que possui um gene de marca de resistência para cloranfenicol e que é conhecido por ser compatível com *B. seminalis*. A metodologia de transformação foi a mesma utilizada para transformação de TC3.4.2R3 com o vetor *all-in-one* pSF.

3.2.6.3.2 Sistema de CRISPR/Cas9 com dois vetores

O sistema de CRISPR/Cas9 com dois vetores descrito por Jiang *et al.* (2015), que é composto pelos plasmídeos pCas e pTargetF (gentilmente cedidos pela Profa. Luiziana Ferreira da Silva (Departamento de Microbiologia, ICB-USP) foi testado para a mutagênese do gene Bsem_02858 em TC3.4.2R3.

O plasmídeo pCas expressa o gene que codifica a nuclease Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, o de resistência ao antibiótico canamicina, o replicon repA101 para autodepuração (sensível a temperatura), o gene λ -Red para recombinação homóloga do cassete de DNA doador, sob o controle do promotor Parab (induzido por L-arabinose). Além disso o pCas também carrega um sgRNA com N₂₀ alvo no replicon pMB1 do plasmídeo pTargetF (sgRNA-pMB1) sob controle de um promotor induzido por IPTG, Ptrc. O plasmídeo pTargetF carrega sequências do sgRNA (tracrRNA:crRNA), do promotor pJ23119, o gene *aadA* para resistência espectinomicina, do replicon pMB1 e múltiplos sítios de restrição (JIANG *et al.*, 2015).

3.2.6.3.2.1 Construção do cassete de DNA doador

A construção do DNA doador utilizado como molde para recombinação homóloga foi realizada por meio da geração de fragmentos *upstream* e *downstream* do gene Bsem_02858 por meio de PCR, utilizando primers específicos (Tabela 3.4).

Tabela3.4-PrimersdesenhadosparaconstruçãodecassetedeDNAdoador(Homo_Bsem_02858) para mutagênese de Bsem_02858 via CRISPR/Cas, sistema de dois vetores

Homo_MTase01F	CCAACGATTGACGGTGTTC	63
Homo_MTase02R	GTTCCCGTTTGCCGAA CTTCTTTTTCCATCGAGGTTGC	_
Homo_MTase03F	GCAACCTCGATGGAAAAA GAAGTTCGGCAAACGGGAAC	66
Homo_MTase04R	CATCTGAGTGGTGCTGCAAG	_

^aRegiões de sobreposição estão em negrito

Ta, temperatura de anelamento utilizada para PCR

O 1° round de PCR foi realizado com o gDNA de TC3.4.2R3 para obtenção dos fragmentos Homo_UP e Homo_DN de aproximadamente 500 pb (Figura 3.5), utilizando a enzima Q5 DNA polimerase (NEB). Os produtos obtidos no 1° round de PCR foram utilizados como DNA molde para o 2° round de PCR, que consistiu na montagem do cassete de DNA doador, Homo_Bsem_02858. A enzima ExTaq Polimerase foi utilizada para a junção dos fragmentos Homo_UP e Homo_DN, seguindo as recomendações do fabricante: 10 μ L de 10 x Ex Taq Buffer; 2 μ L de dNTP [10 mM]; 2 μ L de cada primer [10 μ M] – adicionados apenas após a etapa de pré-tratamento; 1 μ L de Homo_UP e Homo_DN [100 ng/ μ L]; 0,5 μ L de ExTaq Polimerase, H₂O Milli-Q para completar o volume final de 100 μ L.

Figura 3.5 - Representação esquemática da posição de anelamento dos primers desenhados para construção do cassete de DNA doador, gerando fragmentos Homo_UP e Homo_DN, quando unidos pelo o 2° round de PCR originam o DNA doador, Homo_Bsem_02858



FONTE: Tsui (2021)

Um pré-tratamento das reações contendo todos os reagentes para a PCR com exceção dos primers foi realizado nas condições: desnaturação inicial de 2 minutos a 94° C, seguido de 3 ciclos de 30 segundos a 94° C; um ciclo de 30 segundos a 55° C e 30 segundos a 68°C. Em seguida, os primers foram adicionados nos volumes descritos acima e a reação prosseguiu nas condições: um ciclo de 2 minutos a 68°C, seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 56°C e 5 minutos a 68°C e uma extensão final de 10 minutos a 68°C em termociclador. O produto das reações, cassete de DNA doador Homo_Bsem_02858 de 914 pb foi analisado em gel de agarose, purificado, quantificado em nanodrop e estocado em freezer -20°C para etapas subsequentes.

3.2.6.3.2.2 Construção do plasmídeo pTarget_MTF

O plasmídeo pTarget_MTF foi construído a partir de uma modificação no plasmídeo pTargetF que apresenta uma sequência de sgRNA (gRNA *scaffold* composto por crRNA e tracrRNA sintéticos) para o gene-alvo (gene *cadA*) de estudo dos autores que descreveram a metodologia (JIANG *et al.*, 2015). A sequência a ser substituída corresponde apenas ao N₂₀ gene-específico para o Bsem_02858. No entanto, todo fragmento de DNA que flanqueia o N₂₀ (144 pb) foi substítuido para facilitar a seleção e identificação do novo vetor (delimitado pelos sítios de restrição das enzimas *Bam*HI e *Eco*RI). A sequência de N₂₀ utilizada foi a mesma utilizada pela empresa Oxford Genetics que sintetizou o vetor *all-in-one* pSF (item 3.2.6.3.1) mais próxima da extremidade 5' do gene Bsem_02858 (gRNA1), sendo a sequência 5'-ATCGTGAGACGCCTCATGCG-3'.

O inserto para edição do gene Bsem_02858 foi desenhado e sintetizado como primer, sendo composto pela sequência inalterada do promotor J23119 (já presente em pTargetF), sequência N₂₀ (alvo no gene Bsem_02858) e a sequência que compõe a estrutura do sgRNA (já presente em pTargetF). Foram sintetizadas as sequências sgRNA(1) – *forward* e seu reverso complemento sgRNA(1) – *reverse*, ambas com 144 pb, cujo terminal coesivo 5' apresenta sítio para reconhecimento de *Bam*HI e o terminal 3' coesivo para *Eco*RI (Figura 3.6). Essas sequências foram eluídas a 100 μ M em tampão TE (1M de Tris HCl pH 8.0 e 0,5M de EDTA pH 8.0).

Figura 3.6 - Representação de região do pTargetF a ser substituída para construção do vetor pTarget_MTF. Um primer de 144 pb foi sintetizado para substituir a sequência N₂₀, representada pelo fragmento em amarelo (gene alvo cadA) pelo N₂₀ específico para o gene Bsem_02858 de TC3.4.2R3 (fragmento em verde), os fragmentos na cor azul foram mantidos (promotor J23119 e sgRNA). A inserção desse fragmento (após tratamento para formar uma dupla fita de DNA) no vetor pTargetF originou o vetor pTarget_MTF



FONTE: Tsui (2021)

A formação de dupla fita desse inserto se deu com uma reação de fosforilação, utilizando a enzima T4 polinucleotide Kinase (PNK) (NEB), utilizando 2 µM de cada uma das sequências; 1x do tampão T4 ligase Buffer (NEB) e 200 U/mL da enzima T4 PNK em um volume final de 50 µL. Em seguida, a reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 2,5 µL de solução de NaCl 1M à reação de fosforilação e incubou-se a 95°C por 6 minutos para anelamento dos oligonucleotídeos. Posteriormente, as reações foram resfriadas por 2 horas à temperatura ambiente, e então purificadas a partir do gel de agarose.

O pTargetF e o inserto contendo o sgRNA para Bsem_02858 foram duplamente digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI (NEB) seguindo as recomendações do fabricante. Tanto o plasmídeo linearizado como o inserto foram

purificados a partir do gel de agarose e submetidos à ligação, utilizando a enzima T4 ligase (NEB), de acordo com as recomendações do fabricante.

A ligação do vetor pTargetF (2.117 pb) com inserto (sgRNA_MTase - que contém o N₂₀ com alvo em Bsem_02858) de 144 pb ocorreu com as seguintes tentativas de razão vetor:inserto, 1:1, 1:2,1:3, 1:4, 1:5, 1:6 e 1:7. A concentração do vetor utilizada foi 100 ng/µL enquanto a concentração do inserto foi ajustada de acordo com a razão de ligação testada, sendo respectivamente, 6,7 ng, 14 ng, 20 ng, 33 ng e 46 ng. A transformação foi realizada por choque elétrico em células de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes. A transformação do pTarget_MTF em células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α foi realizada com 10 µL da reação de ligação. As células transformantes foram semeadas em meio LBA suplementado com espectinomicina (100µg/mL).

A identificação de transformantes contendo o pTarget_MTF foi realizada por meio de PCR de colônia, utilizando os primers pT_2858_Fw (5'-CTAGTATCGTGAGACGCCT-3') e pTarget_Rv (5'- ATTGCACTCCACCGCTGATG-3'). A enzima GoTaq polimerase foi utilizada para a PCR de colônia (item 3.2.3).

3.2.6.3.2.3 Transformação de TC3.4.2R3 com pCas

Seguindo o protocolo de transformação por eletroporação de TC3.4.2R3 (item 3.2.4), nenhum mutante de TC3.4.2R3 contendo o plasmídeo pCas foi obtido. Dessa forma, foi feita a mobilização do plasmídeo pCas em TC3.4.2R3 via conjugação triparental (Figura 3.1). O plasmídeo pCas foi extraído e transformado em células cálcio-competentes de *E. coli* GT115 (item 3.2.4), com auxílio da linhagem auxiliar pRK2013, o plasmídeo pCas foi introduzido em TC3.4.2R3 via conjugação, utilizando placas contendo meio LBA suplementadas com canamicina (300 μ g/mL), ampicilina (100 μ g/mL) e gentamicina (15 μ g/mL) para selecionar apenas a linhagem TC3.4.2R3. Visto que os antibióticos ampicilina e gentamicina foram adicionados para inibir o crescimento de *E. coli* e TC3.4.2R3, portanto células contendo pCas são capaz de crescer em canamicina (300 μ g/mL).

A confirmação dos exconjugantes TC3.4.2R3::pCas foi realizada por meio de PCR de colônia (item 3.2.3) utilizando primers desenhados para detecção da região intergênica dos genes de resistência a canamicina e da nuclease pCas9 (Tabela 3.5), gerando um produto de 888 pb. A confirmação dos exconjugantes da linhagem TC3.4.2R3 foi realizada com os primers RT-PCR_2858_Fw e RT-PCR_2858_Rv, que anelam no gene Bsem_02858 (Tabela 3.9), gerando um produto de 644 pb.

Tabela 3.5 - Primers desenhados para detecção do plasmídeo pCas após conjugação triparental em TC3.4.2R3

Nome do primer	Sequência (5′ → 3′) ª	Ta (°C)
pCas9KmF	ACGCTACCTTTGCCATGTTT	52
pCas9KmR	CGCTGTCTCCCACTGTCAA	
tomporatura do an	alamanta utilizada para PCP	

Ta, temperatura de anelamento utilizada para PCR

3.2.6.3.2.4 Nocaute de Bsem 02858 utilizando o sistema de dois plasmídeos

A linhagem mutante TC3.4.2R3::pCas foi crescida em meio LB suplementado com canamicina (300 µg/mL) e L-arabinose (10mM) e células eletrocompetentes de TC3.4.2R3::pCas foram obtidas (item 3.2.4). Assim, 100 µL de células eletrocompetentes de TC3.4.2R3::pCas foram utilizadas para eletroporação juntamente a 2 µL do plasmídeo pTarget_MTF (previamente extraído) e 600 ng do cassete de DNA doador, Homo_Bsem_02858 (Figura 3.7). Após transformação, as células foram incubadas para crescimento a 28°C por 3 horas sob agitação constante de 200 rpm. Em seguida as células transformantes foram semeadas em meio LBA suplementado com canamicina (300 µg/mL), espectinomicina (300 µg/mL) e L-arabinose (10mM).

Figura 3.7 - Esquema representativo de nocaute de Bsem_02858 de TC3.4.2R3 via CRISPR/Cas, sistema de dois vetores





Foram selecionadas 31 UFCs para identificação de possíveis candidatos mutantes de Bsem_02858 via PCR de colônia utilizando os primers Homo_MTase01F e Homo_MTase04R com a enzima GoTaq DNA polimerase (item 3.2.3).

3.2.6.4 Sistema de deleção I-Scel

O método de deleção gênica pGPI-Scel/pDAI-Scel-SacB baseado no sistema de endonuclease I-Scel (FLANNAGAN *et al.*, 2008) foi testado para a deleção do gene Bsem_02858 e do cluster n-TASE (genes Bsem_02857, Bsem_02858,

Bsem_02859 e Bsem_02860). Um par de primers gib_up_Δbs2858_Fw e gib_up_Δbs2858_Rv (Tabela 3.6), que amplificam uma região a montante do gene Bsem_02858 foram desenhados especificamente para a sua deleção. Além disso, para amplificar uma região a jusante do gene Bsem_02858, foram utilizados os primers gib_dw_Δbs2858_Fw e gib_dw_Δbs2858_Rv (Tabela 3.6).

Nome do primer	Sequência (5' → 3') ^{a,b,c}	Enzima de restricão
		*
gib_up_∆cluster_Fw	CGGATCCCAAGCTTCTTCTAGAACGGTCCATCTGTGACTACC	N/A
gib_up_∆cluster_Rv	AGCTTCATCGCCAATGACTG	N/A
gib_dw_∆cluster_Fw	tttacagtcattggcgatgaagctTAAAAACGCGGCCCTACTAC	N/A
gib_dw_∆cluster_Rv	GCTCGATATCGCATGCGGTACC ACCAGAACGCCGGCATCAAG	N/A
gib_up_∆bs2858_Fw	CGGATCCCAAGCTTCTTCTAGAATTGACGGTGTTCAGCGAATA	N/A
	C	
gib_up_∆bs2858_Rv	CGACGACGATACCTTGTTCC	N/A
gib_dw_∆bs2858_Fw	tggcggaacaaggtatcgtcgtcgGTGGACGATGTTGCTCTGC	N/A
gib_dw_Abs2858_Rv	GAGCTCGATATCGCATGCGGTACC ATCTGAGTGGTGCTGCAA	N/A
	G	
Bsem2856_clusterFw	AAGGAAGCAAAAGCTCGCC	N/A
Bsem2861_clusterRv	TGTGGAAGAAGGCATCGTGG	N/A
#1300	TAACGGTTGTGGACAACAAGCCAGGG	N/A
#3627	GCCCTACACAAATTGGGAGATATATC	N/A
Cond-Bsem2858 Ndel-	GCTAGTCG <u>CATATG</u> AAGATGGCGCGCGCGCATGGCGGAACAA	Ndel
Fw	GG	
Cond-Bsem2858 Xbal-	GACCCGA <u>TCTAGA</u> GGCATGGACGTCCTGCGCTTCGATTCG	Xbal
Rv		
#824	GCCCATTTTCCTGTCAGTAACGAGA	N/A
Ome_bs2821_Fw	AAT <u>TCTAG</u> GTGATGGAAACCGAGGTGTG	Xbal
Ome_bs2821_Rv	TAT <u>TCTAG</u> ATGTCGAACTTCAGGTTGC	Xbal
Ome_bs2838_Fw	AAT <u>TCTAGA</u> GAAGACGTTCGACCTCGGTT	Xbal
Ome_bs2838_Rv	TAT <u>TCTAGA</u> CGACAACGTGAAAAGCGGAG	Xbal
Ome_bs2840_Fw	AAT <u>TCTAGA</u> GTGATCTTCTCGCGGGTCAT	Xbal
Ome_bs2840_Rv	TAT <u>TCTAGA</u> TACCAGGAACGCAACGAACA	Xbal
Ome_bs2841_Fw	AAT <u>TCTAGA</u> TACCGGCTTTGGCTACATCG	Xbal
Ome_bs2841_Rv	TAT <u>TCTAGA</u> AGGAATCTCGAGCATCTGCG	Xbal
Ome_bs2843_Fw	AAT <u>TCTAGA</u> GGCTGCACTACCAGATCGAG	Xbal

Tabela 3.6 - Primers utilizados nas técnicas de deleção I-Scel e inserção por pGPΩTp

Ome_bs2843_Rv	TAT <u>TCTAGA</u> CTTGTACAGGAATTGCGCGG	Xbal
Ome_bs2845_Fw	AAT <u>TCTAGA</u> TCCGCAATTCTCCGAAACGA	Xbal
Ome_bs2845_Rv	TAT <u>TCTAGA</u> GCAGTGATCACCGACGTACA	Xbal
Ome_bs2857 _Fw	AAT <u>TCTAGA</u> AATCGACCATTTCTCGCC	Xbal
Ome_bs2857 _Rv	TAT <u>TCTAGA</u> CGAACCGATGCTTTTGAC	Xbal
Ome_bs2858_Fw	AAT <u>TCTAGA</u> ATCCATGAAATCGGCTGCG	Xbal
Ome_bs2858 _Rv	TAT <u>TCTAGA</u> TCCAGCACTTCACAGCAGAC	Xbal
Ome_bs2859 _Fw	AAT <u>TCTAGA</u> GGCAAGCAATCAGCATC	Xbal
Ome_bs2859 _Rv	TAT <u>TCTAGA</u> GCGACAAACAAAAATGCCG	Xbal
Ome_bs2860 _Fw	AAT <u>TCTAGA</u> CGGAGTCGTGCTGATGAAAG	Xbal
Ome_bs2860_Rv	TAT <u>TCTAGA</u> GGATGAACAGAGCCCAGAAC	Xbal
Comp_Tag_58_Ndel_F	AAT <u>CATATG</u> AAGATGGCGCGCGCGCATG	Ndel
W		
Comp Tag 58 Xbal Rv	TATTCTAGAAGGGCGGCAGAGCAACATCG	Xbal

^a Sítios de reconhecimento de enzimas de restrição incorporados na sequência de primers estão sublinhados

^b Regiões de homologia ao pGPI-Scel estão em negrito

^cRegiões de homologia ao gene de interesse estão em letra minúscula

* N/A indica a ausência de sítio de reconhecimento de enzima de restrição

Ambas as regiões foram amplificadas a partir de DNA genômico purificado de *B. seminalis* TC3.4.2R3 por meio de PCR utilizando a enzima OneTaq[®] DNA Polymerase (New England Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante e realizada nas seguintes condições de reação: 94°C durante 5 min seguidos por 30 ciclos de 94°C durante 30 s; 55°C durante 30 s e 68°C durante 1 min; extensão final a 68°C por 5 min em termociclador.

A deleção do cluster n-TASE foi realizada a partir da clonagem de duas regiões de homologia no plasmídeo pGPI-Scel. A região a montante do gene Bsem_02857 (primeiro gene do cluster) foi amplificada por PCR utilizando os pares de primers gib_up_\Delta cluster_Fw e gib_up_\Delta cluster_Rv (Tabela 3.6) e para a sua região a jusante, o gene Bsem_02860 (úlimo gene do cluster) foi também gib_dw__cluster_Fw amplificado por PCR utilizando os primers е gib_dw__cluster_Rv (Tabela 3.6). As sequências upstream e downstream do cluster n-TASE foram amplificadas a partir de DNA genômico extraído de B. seminalis TC3.4.2R3 por PCR nas seguintes condições de reação: 94°C durante 5 min seguido por 30 ciclos de 94°C durante 30 s; 55°C durante 30 s; e 68°C durante 10 min; extensão final a 68°C por 5 min.

As duas sequências de DNA flanqueadoras da região alvo foram ligadas no plasmídeo suicida pGPI-Scel (Tabela 3.1) digerido com a enzima Xbal, por meio do método GIBSON, que consiste em uma montagem isotérmica com uma única reação de múltiplas moléculas de DNA que se sobrepõe pela ação combinada de uma exonuclease 5', uma DNA polimerase e uma DNA ligase (GIBSON et al., 2009). Assim, 5 µL de cada uma das sequências de DNA a serem ligadas (duas sequências flanqueadoras da região alvo e o plasmídeo pGPI-Scel digerido com Xbal) em quantidades equimolares foram adicionadas a 12,5 µL da mistura GIBSON master *mix* (320 µL de 5X tampão de reação isotermal; 0,64 µL de 10 U/µL de exonuclease T5, 20 μ L of 2 U/ μ L de DNA polymerase Phusion, 160 μ L de 40 U/ μ L de Tag DNA ligase e água Milli-Q para o volume final de 1,2 mL. Alíquotas de 12,5 µL podem ser feitas e estocadas a -20°C). O tampão de reação isotermal 5X é preparado da seguinte maneira, 3 mL de Tris-HCl 1M pH 7,5 combinados a 150 µL de MgCl₂ 2M, 60 μL de dGTP 100 mM; 60 μL de dATP 100 mM; 60 μL de dTTP 100 mM; 60 μL dCTP 100 mM; 300 µL de 1 M DTT; 1,5 g de PEG-8000 e 300 µL de NAD 100 mM a um volume final de 6 mL. O tampão de reação isotermal pode ser dividido em alíqutotas e estocadas a -20°C. A reação de ligação pelo método GIBSON foi incubada por 1 hora a 50°C.

Após incubação, 10 µL de cada reação de ligação por GIBSON (para o gene Bsem_02858 e para o cluster n-TASE) foram clonados por choque térmico em células competentes de *E. coli* GT115 (Invitrogen) (Tabela 3.1). Após a transformação, as células foram semeadas em placas de Petri contendo meio SOB -*Super Optimal Broth* suplementado com o antibiótico trimetoprima a uma concentração final de 50 µg/mL e incubadas a 37°C por 18 horas sob agitação constante (200 rpm). A busca de clones positivos para as transformações foi feita por PCR de colônia utilizando o par de primers #1300 e #3627 (Tabela 3.6), localizados em cada lado da região do MCS (múltiplos sítios de clonagem) do plasmídeo pGPI-Scel. As seguintes condições foram utilizadas para a PCR de colônia para triagem de clones positivos: 95°C por 1 min seguido por 25 ciclos de 95°C por 40 s; 52°C durante 40 s; e 72°C durante 2 min; extensão final a 72°C por 3 min. Após confirmação de clones positivos, dois clones de cada uma das mutagêneses (do gene Bsem_02858 e do cluster) foram selecionados para a extração de plasmídeo (QIAprep Spin Miniprep Kit - QIAGEN) seguida de sequenciamento utilizando o primer #1300 para confirmar a clonagem e verificar se os fragmentos de DNA foram clonados sem qualquer mutação pontual.

Os plasmídeos de mutagênese confirmada, pDel2858 e pDel5760 (correspondentes ao pGPI-Scel contendo a construção deletéria do gene Bsem_02858 e pGPI-Scel contendo a construção deletéria do cluster n-TASE, respectivamente) foram transferidos para a linhagem selvagem *B. seminalis* TC3.4.2R3, via conjugação triparental como descrito por AUBERT *et al.* (2014) com algumas modificações (Figura 3.1).

A linhagem doadora (E. coli GT115 carregando plasmídeo de mutagênese pDel2858 ou pDel5760) foi cultivada em meio LB líquido suplementado com 50 μ g/mL de trimetoprima, a linhagem auxiliar - *helper* (*E. coli* DH5 α carregando o plasmídeo pRK2013) foi cultivada em meio LB líquido suplementado com 40 µg/mL de canamicina. A bactéria receptora (B. seminalis TC3.4.2R3 selvagem) foi cultivada em meio LB líquido, incubada a 30°C sob agitação de 200 rpm e as linhagens de *E*. coli foram incubadas a 37°C sob agitação de 200 rpm por aproximadamente 18 horas. As culturas bacterianas tiveram sua densidade óptica ajustada para D. O.600nm = 2,5 em meio LB líquido. A proporção de doador:helper:receptor deve ser 3:3:1, para isso, 1 mL das linhagens doadora e *helper* e apenas 330 µL da linhagem receptora foram centrifugados (13.000 rpm, 1 min, temperatura ambiente) para obtenção de seus pellets. Os três pellets bacterianos foram ressuspendidos juntos em 1 mL de meio LB líquido e subsequentemente centrifugados nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o pellet contendo a mistura das três linhagens foi resuspendido em 50 µL de meio SOB líquido e foi semeado em forma de uma gota (evitando-se a formação de bolhas) sobre uma placa de Petri contendo meio SOB sólido e foi imediatamente incubada a 30°C durante 24 horas. No dia seguinte, a gota bacteriana foi recuperada da placa com auxílio de alça de inoculação e então resuspendida em 1 mL de 1X PBS - tampão fosfato salino (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 8 mM e KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4). Cem microlitros de suspensão bacteriana foram semeados em placa de Petri de meio SOB contendo trimetoprima na concentração de 100 µg/mL (para selecionar os co-integrantes de *Burkholderia*) e gentamicina 15 μg/mL (para evitar o crescimento de linhagens *E. coli* doadora e *helper*). As placas foram incubadas a 30°C por 2 dias.

Uma colônia apresentando resistência à trimetoprima foi selecionada de cada uma das conjugações (gene Bsem_02858 e cluster). As linhagens cointegrantes de *B. seminalis*, denominadas Δ 2858 e Δ 5760 (Tabela 3.1), para cada mutagênese, foram crescidas em meio LB líquido sem adição de trimetoprima e foram incubadas a 30°C por 18 horas com agitação a 200 rpm.

Assim, a resolução dos co-integrantes foi feita por meio do uso da endonuclease I-Scel, em que a linhagem *E. coli* DH5 α que carrega os plasmídeos pDAI-SceI-SacB e pRK2013 (denominada neste estudo de linhagem BOTH) foi cultivada em meio LB líquido com adição de tetraciclina a concentração final de 20 µg/mL e canamicina a 40 µg/mL e foi incubada a 37°C com agitação de 200 rpm. No dia seguinte, 1 mL da linhagem doadora *E. coli* DH5 α -BOTH (contendo os plasmídeos pDAI-Scel-SacB e pRK2013) e 300 µL de suspensão da linhagem receptora (*B. seminalis* Δ 2858 ou Δ 5760), ambas a D. O._{600nm} 2,5 foram centrifugados (16.000xq, 1 min) e o sobrenadante foi removido. Os pellets bacterianos foram misturados em 1 mL de meio LB líquido e em seguida centrifugados, sendo o sobrenadante removido. O pellet contendo a mistura das linhagens de conjugação foi resuspendido em 50 µL de meio SOB líquido e semeado em forma de uma gota (evitando-se a formação de bolhas) sobre meio SOB sólido e incubada a 30°C por 24 horas. Após a incubação, a gota bacteriana foi ressuspendida em 1 mL de PBS foram feitas diluições em série com 1 mL de PBS até 10⁻¹², para garantir o desenvolvimento de colônias isoladas. Dessa forma, 100 µL das diluições 10⁻⁸, 10⁻¹⁰ e 10⁻¹² foram semeadas sobre meio SOB suplementado com tetraciclina 100 µg/mL (para selecionar Burkholderia carregando o plasmídeo pDAI-SceI-SacB) e gentamicina 15 µg/mL (para evitar o crescimento de E. coli) e incubadas a 30°C durante 2 dias. Depois disso, 300 colônias de cada mutagênese foram repicadas em duas placas de meio SOB, uma contendo tetraciclina a 100 µg/mL e gentamicina 15 µg/mL (exatamente igual àquela utilizada para seleção da linhagem de Burkholderia carregando o plasmídeo pDAI-Scel-SacB) e a outra placa contendo trimetoprima 100 µg/mL e tetraciclina a 100 µg/mL (após conjugação com a linhagem *BOTH* contendo pDAI-SceI-SacB, a sequência responsável pela resistência a trimetoprima é removida via endonuclease I-SceI).

Dessa maneira, apenas colônias que apresentam resistência a tetraciclina e sensibilidade a trimetoprima foram selecionadas para uma triagem utilizando uma combinação de primers em que a sequência *forward* deve se anelar à região de homologia à montante e a sequência de primer *reverse* deve se anelar à jusante da região de homologia (por exemplo, gib_up_cluster_Fw e gib_dw_cluster_Rv para a mutagênese do cluster n-TASE).

3.2.6.4.1 Essencialidade de Bsem_02858

O plasmídeo pSC200 (ORTEGA *et al.*, 2007) foi usado para verificar se o gene Bsem_02858 é essencial para a sobrevivência de TC3.4.2R3. Esse plasmídeo permite a integração do promotor P_{rhaB} , que é induzido por ramnose, no genoma para dirigir a expressão de um gene alvo. A mutagênese condicional pSC200 é baseada na expressão condicional do gene alvo regulado pelo promotor P_{rhaB} na presença de ramnose, o que significa que, se o gene for essencial, não permitirá o crescimento bacteriano na ausência de ramnose. Em contraste, um mutante condicional para um gene não essencial crescerá normalmente na presença ou ausência de ramnose (ORTEGA *et al.*, 2007).

Um mutante condicional foi construído para avaliar a essencialidade do gene Bsem_02858 para a viabilidade de TC3.4.2R3, de acordo com a metodologia descrita por Ortega *et al.* (2007) com algumas modificações. A partir do gene Bsem_02858, um fragmento de 342 pb abrangendo a extremidade da região 5' foi amplificado com o par de primers Cond-Bsem2858 Ndel-Fw e Cond-Bsem2858 Xbal-Rv (Tabela 3.6). O fragmento interno foi amplificado com a DNA polimerase OneTaq[®] (New England Biolabs) seguindo as condições de reação: 94°C por 5 min seguido por 30 ciclos de 94°C durante 30 s; 65°C durante 30 s; e 68°C durante 1 min; extensão final a 68°C por 5 min. O fragmento obtido da PCR foi duplamente digerido com enzimas *Ndel/Xba*I e clonado no plasmídeo pSC200 (Tabela 3.1), também duplamente digerido com as enzimas *Ndel/Xba*I.

O fragmento de Bsem_02858 de 342 pb foi ligado ao plasmídeo pSC200 e *E. coli* GT115 cálcio competentes foram transformadas com a ligação (item 3.2.4) e as células transformantes foram semeadas sobre meio LBA com trimetoprima a 50 µg/mL e incubadas a 37°C por 2 dias.

Posteriormente, colônias isoladas resistentes a trimetoprima foram submetidas à PCR utilizando os primers, #824 - anela na região do plasmídeo pSC200 e Cond-Bsem2858 Xbal-Rv - que anela no fragmento proveniente de Bsem_02858 (Tabela 3.6). A PCR foi realizada usando Go Taq Green Master MIX, 2x (Promega), seguindo as seguintes condições de reação: 95°C por 1 min seguido por 25 ciclos de 95°C por 40 s; 72°C durante 40 s; e 72°C durante 2 min; extensão final a 72°C por 3 min. Duas colônias contendo a clonagem desejada foram preparadas para a extração de plasmídeo seguida de sequenciamento de DNA.

Após sua confirmação, o plasmídeo pSC200-MTase (Tabela 3.1) foi mobilizado em TC3.4.2R3 por conjugação triparental (Figura 3.1) e os exconjugantes (colônias resultantes da conjugação) foram semeados em placas contendo meio LBA suplementadas com trimetoprima (100 µg/mL), gentamicina (15 µg/mL) e ramnose a 0,5% (m/v). O mutante condicional do gene Bsem_02858, denominado Cond-2858 é resistente a trimetoprima e foi cultivado a 30°C por 18 horas com agitação de 200 rpm em meio LB líquido com adição de trimetoprima (100 µg/mL) e ramnose a 0,5%. Uma alíquota de 1 mL desta cultura foi centrifugada e seu pellet foi lavado três vezes com PBS estéril, tendo sua densidade óptica (D.O._{600nm}) ajustada a 1,0 em PBS. A suspensão bacteriana não diluída, bem como diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram semeadas em placas de meio LBA suplementadas com glucose a 0,5% (m/v) ou ramnose a 0,5% (m/v) e trimetoprima (100 µg/mL) na forma de gotas de 5 µL e incubadas a 30°C por 24 horas.

3.2.6.4.2 Compatibilidade de vetores em TC3.4.2R3

Foi observada uma extensa dificuldade nos ensaios para a mutagênese de *B. seminalis* TC3.4.2R3, especialmente com relação à viabilidade celular após a clonagem do segundo plasmídeo, pDAI-SceI-SacB via conjugação. Por esse motivo, outros plasmídeos (Tabela 3.7) foram clonados via conjugação triparental (Figura 3.1) em *B. seminalis* TC3.4.2R3 selvagem (sem serem linhagens co-integrantes contendo a integração de pDel2858 ou pDel5760), visando a verificação da

sobrevivência da linhagem selvagem após a conjugação triparental com os diversos plasmídeos.

Tabela 3.7 - Lista de plasmídeos testados na avaliação da compatibilidade de vetores com *B. seminalis* TC3.4.2R3

Plasmídeo	Características relevantes	Fonte e/ou referência
pDA12	Vetor de clonagem, <i>ori</i> _{pBBR1} , Tet ^R , mob ⁺ , <i>P</i> _{dhfr}	Aubert <i>et al.</i> (2008)
pDAI-Scel	ori _{pBBR1} , Tet ^R , mob ⁺ , P _{dhfr} , epítope FLAG,	Flannagan <i>et al</i> . (2008)
	gene I-Scel	
pDAI-Scel-SacB	pDAI-Scel carregando o gene SacB	Hamad <i>et al</i> . (2012)
pSCRhaB2	ori _{pBBR1} , rhaR, rhaS, P _{rhaB} , Tmp ^R , mob ⁺ ,	Cardona; Mueller e Valvano
	orientação oposta do cassete dhfr	(2006)
pBBRMCS-3	Vetor de clonagem, mob ⁺ , Tet ^R	Kovach <i>et al.</i> (1994)

Tmp^R, resistência a trimetoprima; Tet^R, resistência a tetraciclina

3.2.6.5 Mutagênese por inserção de pGPΩTp

3.2.6.5.1 Obtenção de mutantes

A mutagênese insercional foi realizada por meio da metodologia (FLANNAGAN *et al.*, 2007) que utiliza o plasmídio suicida pGP Ω Tp (FREY; KRISCH, 1985), que codifica um gene para resistência à trimetoprima e transporta uma origem de replicação R6K dependente da proteína *Pir*. A inserção de um plasmídeo pGP Ω Tp em um gene alvo resulta em uma mutação polar devido à presença de fragmentos ômega (Ω), que estão flanqueando o cassete de resistência a um antibiótico, neste caso, a trimetoprima.

Os fragmentos ômega são responsáveis pela terminação precoce de síntese de RNA e proteínas, permitindo assim a geração de mutantes polares, devido à estrutura simétrica dos fragmentos ômega (flanqueando um cassete de resistência a antibiótico), o mesmo efeito é obtido com inserções em qualquer orientação (PRENTKI; KRISCH, 1984). Por essa razão, os primers foram desenhados apenas com o sítio de reconhecimento *Xba*I para ambas as extremidades do fragmento de inserção

Um fragmento interno amplificado por PCR de 221 pb do gene Bsem_02858 de *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi obtido utilizando o par de primers Ome_bs2858_Xbal_Fw e Ome_bs2858_Xbal_Rv (Tabela 3.6). O fragmento interno foi amplificado com a DNA polimerase OneTaq[®] (New England Biolabs) seguindo as seguintes condições de reação: 94°C durante 5 min seguido por 30 ciclos de 94°C durante 30 s; 52°C durante 30 s; e 68°C durante 30 s; extensão final a 68°C por 5 min. O fragmento resultante, amplicon denominado Ω2858, foi digerido com a enzima de restrição *Xba*I e ligado ao plasmídeo pGPΩTp também digerido com *Xba*I e transformado em células cálcio competentes de *E. coli* SY327 (item 3.2.4).

As reações de PCR de colônia para triagem de clones positivos foi realizada com o par de primers #1300 e #3627 (Tabela 3.6) usando Go Taq Green Master MIX, 2x (Promega) nas seguintes condições: 95°C por 1 min seguido por 25 ciclos de 95°C por 40 s; 52°C durante 40 s; e 72°C durante 2 min; extensão final a 72°C por 3 min. Após confirmação, dois clones positivos, obtidos pela mutagênese por inserção do gene Bsem_02858, foram selecionados para a extração de plasmídeo (QIAprep Spin Miniprep Kit - QIAGEN) seguida de sequenciamento utilizando o primer #1300 para confirmação da clonagem. Após confirmação por sequenciamento, o plasmídeo resultante, denominado pSST2858 (Tabela 3.1) foi clonado em *B. seminalis* TC3.4.2R3 por conjugação triparental (Figura 3.1) e os exconjugantes resultantes foram selecionados quanto à resistência ao antibiótico trimetoprima.

As colônias, candidatas à mutantes por inserção do gene alvo Bsem_02858, foram identificadas por PCR utilizando o primer #1300 (Tabela 3.6) que anela no plasmídeo pGPΩTp combinado ao primer Detec_bs2858_Fw (Tabela 3.8) que anela especificamente à região do cromossomo de TC3.4.2R3. A Go Taq Green Master MIX, 2x (Promega) foi utilizada para a cPCR nas condições: 95°C durante 1 min seguido por 25 ciclos de 95°C durante 40 s; 52°C durante 40 s; e 72°C durante 2 min; extensão final a 72°C por 3 min. O mutante insercional do gene *Bsem_02858* foi denominado *B. seminalis* SST58 (Tabela 3.1).

Para o mutante SST57 de *B. seminalis* TC3.4.2R3 (Tabela 3.1), um fragmento interno de 273 pb do gene de glicosiltransferase Bsem_02857 foi amplificado por PCR utilizando os primers Ome_bs2857_Fw e Ome_bs2857_Rv (Tabela 3.6). O produto de amplificação resultante (Ω2857) foi clonado em pGPΩTp dando origem ao plasmídeo pSST2857 (Tabela 3.1), que foi sequenciado para confirmação e mobilizado em TC3.4.2R3 por conjugação triparental. Os mutantes candidatos foram identificados por PCR utilizando o primer Detec_bs2857_Fw (Tabela 3.8) que anela especificamente ao gene Bsem_02857, combinado ao primer que anela no plasmídeo, #1300 (Tabela 3.6).

A construção do outros mutantes insercionais para outros genes de *B. seminalis* TC3.4.2R3 (Bsem_02821, Bsem_02838, Bsem_02840, Bsem_02841, Bsem_02843, Bsem_02845, Bsem_02859 e Bsem_02860) foi realizada de maneira semelhante àquela descrita para o mutantes SST57 e SST58. Sendo utilizados respectivos pares de primers (Tabela 3.6 - por exemplo para o gene Bsem_02821, primers contendo o código "bs2821" no nome) para a geração do fragmento interno com ~250 pb, que foram digeridos com *Xba*I e clonados em pGPΩTp.

Tabela 3.8 - Primers desenhados para a detecção de cada gene localizado no *cluster* de quatro genes em *B. seminalis* TC3.4.2R3, do cluster. O número presente no nome de cada primer corresponde ao número do locus do gene alvo em *B. seminalis* TC3.4.2R3 (por exemplo: gene Bsem_02858 e primers em par Detec_bs2858_Fw e Detec_bs2858_Rv)

Gene alvo	Nome do primer	Sequência (5′ → 3′)	Temperatura	Tamanho do
			de	amplicon (pb)
			anelamento	
Bsem_02857	Detec_bs2857_Fw	CATTCCTGCGCTCATTCGAC		
	Detec_bs2857_Rv	TGATTGCGATCAACAGCGTC	53°C	566 bp
Bsem_02858	Detec_bs2858_Fw	GAATCCGATCGTGAGACGCC		
	Detec_bs2858_Rv	GAATGCCTGTTTCGACCAGC	54°C	478 bp
Bsem_02859	Detec_bs2859_Fw	CCAAATACACGCCAGGCAAC		
	Detec_bs2859_Rv	TGTGCAGCAAACCGTACAGG	55°C	483 bp
Bsem_02860	Detec_bs2860_Fw	ATGGGCTCACTCCGGATACTC		
	Detec_bs2860_Rv	TCAAGTTCAGCCGACGATGG	55°C	1.320 bp
Bsem_02861	Detec_bs2861_Fw	CGAAGGCATGAAGTACGTCG		
	Detec_bs2861_Rv	CTGCGTTGTAGCCGTAGTTG	53°C	1.139 bp

3.2.6.5.2 Teste de estabilidade

Uma colônia isolada das linhagens *B. seminalis* SST58 e SST57 foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido suplementado com trimetoprima a 100 µg/mL e incubada sob agitação de 200 rpm a 30°C por 18 horas. Após este período, 50 µL da cultura bacteriana foram adicionadas em 50 mL de meio LB líquido sem adição de trimetoprima e após 24 horas de crescimento nas condições citadas acima, alíquotas da cultura foram diluídas e semeadas em placas contendo meio LBA sem adição do antibiótico trimetoprima e então incubadas a 30°C por 24 horas. Posteriormente, 100 colônias resultantes foram selecionadas de forma aleatória e foram semeadas em placas contendo meio LBA suplementado com antibiótico trimetoprima a 100 µg/mL, incubadas por 24 horas a 30°C. Foram selecionadas 20 colônias aletatoriamente e estas foram submetidas a PCR de colônia utilizando o primer Detec_bs2857_Fw (para SST57) ou Detec_bs2858_Fw (para SST58) (Tabela 3.8) combinado com o primer #1300 que anela no plasmídeo pGP Ω Tp. O mesmo procedimento foi realizado com 20 colônias aleatórias incubadas por 48, 72 e 144 horas.

3.2.7 Complementação gênica dos mutantes SST57 e SST58

Para complementar B. seminalis SST57 (quatro genes inativados) e SST58 (três genes inativados) com o gene metiltransferase Bsem_02858 (inativado em ambos os mutantes), este foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de TC3.4.2R3 utilizando 0 par de primers Comp_Tag_58_Ndel_Fw е Comp_Tag_58_Xbal_Rv (Tabela 3.6) com a DNA polimerase OneTag[®] (New England Biolabs) utilizando as seguintes condições de reação: 94°C durante 5 min seguido por 30 ciclos de 94°C durante 30 s; 60°C durante 30 s; e 68°C durante 30 s; extensão final a 68°C por 5 min. O amplicon resultante (gene Bsem_02858) foi duplamente digerido com as enzimas de restrição Ndel e Xbal e então ligado a um plasmídeo pDA17 (epítopo FLAG) também duplamente digerido com as enzimas de restrição Ndel e Xbal, o mesmo procedimento foi realizado com plasmídeo pDA181 (epitopo 6x HIS).

3.2.8 RT-PCR para confirmação de mutantes SST57 e SST58

Foi realizada a RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) das regiões envolvidas com os genes que sofreram mutação por integração do plasmídeo pGPΩTp para confirmar se a região interrompida estava sendo transcrita nos mutantes.

3.2.8.1 Desenho de primers para RT-PCR

Foram desenhados seis pares de primers (Tabela 3.9) com auxílio do "Primer designing tool" (NCBI programa disponível _ em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Como sequência input, a sequência de cada um dos genes do cluster n-TASE foi inserida para o desenho dos primers que amplificam toda a região codificante do gene em análise (Bsem_02857, Bsem_02858, Bsem_02859 e Bsem_02860). As propriedades e compatibilidade dos primers foram conferidas com auxílio da ferramenta Oligo Calc (BioTools disponível em http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html). Os parâmetros utilizados foram tamanho do primer entre 17-23 pb, temperatura de anelamento entre 57- 63°C, concentração de CG entre 30-60% e tamanho do produto variável dependendo do tamanho da sequência input (até ~1.9 Kb).

Tabela 3.9 - Primers desenhados para a realização de RT-PCR que visa a detecção dos transcritos de cada gene localizado no cluster de quatro genes em *B. seminalis* TC3.4.2R3 e seus mutantes SST57 e SST58

			Temperatura	Tamanho do
Gene alvo	Nome do primer	Sequência (5′ → 3′)	de	amplicon
			anelamento	
Bsem_02857	RT-PCR_2857_Fw	ATGAAGCTAATTATTCAAATCCCAT		
	RT-PCR_2857_Rv	TCATCGGACGACCCCGAATG	53°C	996 pb
Bsem_02858	RT-PCR_2858_Fw	TGAAGATGGCGCGCGGCATGG		
	RT-PCR_2858_Rv	CTACCGTGTCGCGCTGCGAG	63°C	664 bp
Bsem_02859	RT-PCR_2859_Fw	GTGAAGTTCGGCAAACGGGA		
	RT-PCR_2859_Rv	CAGTGCGGGTGTTTGGGGGT	59°C	878 pb
Bsem_02860	RT-PCR_2860_Fw	ATGCGCGACACTCGACGAAA		
	RT-PCR_2860_Rv	TTATTGACGTGGCATGACCA	55°C	1.857 pb

3.2.8.2 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada seguindo o protocolo do kit TRIzol[™] Plus RNA Purification Kit (Ambion) com modificações. As linhagens de *B. seminalis* TC3.4.2R3, SST57 e SST58 foram cultivadas em 5 mL de meio TSB líquido com adição de trimetoprima a 100 µg/mL somente para SST57 e SST58 e incubadas a 28°C por 24 horas sob agitação (200 rpm) até D.O._{600nm} entre 2,5 - 2,7 (fase estacionária). Foram centrifugados 2x 500 µL de cada linhagem bacteriana a 16.000xg por 1 minuto a 4°C e ao pellet bacteriano foi adicionado 1 mL de TRIzol[™] Reagent (ThermoFisher) e ressuspendido. Segundo recomendações do fabricante, o volume de 1 mL de TRIzol é indicado para até 1x10° de células bacterianas. Posteriormente, os 2 microtubos de cada linhagem foram unidos para a etapa de extração.

A mistura de lise (cultura bacteriana com reagente TRIzoI) foi incubada por 4 horas em temperatura ambiente, à ela foram adicionados 200 µL de clorofórmio e homogeneizada vigorosamente por inversão manual durante 15 segundos (é imprescindível que nesta etapa a utilização de vortex seja evitada, pois pode prejudicar as etapas posteriores). A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 3 minutos, centrifugada a 16.000xg por 15 minutos a 4°C e 600 µL da fase aquosa superior foram coletados e à ela foram adicionados 600 µL de etanol 100%. A partir de então, a extração de RNA foi realizada seguindo as recomendações do fabricante do PureLink® RNA Mini Kit (Ambion) para extração de RNA total. A integridade e quantificação do RNA foi verificada em gel de agarose 1% (m/v) e em aparelho NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers.

3.2.8.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com duas amostras de RNA de cada uma das linhagens. Uma com tratamento de DNase I, Amp Grade (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante, em que foram utilizados 10 µL de RNA (equivalente a aproximadamente 1µg do RNA de acordo com a quantificação obtida no NanoDrop) que foram incubados com 1 µL de 10X DNase I Reaction Buffer e 1 µL de DNase I, Amp Grade (1U/µL) por 15 minutos a temperatura ambiente. A reação da DNase foi inativada com adição de 1 µL de EDTA 25 mM seguida de incubação a 65°C por 10 minutos.

A outra amostra para síntese de cDNA foi o RNA sem nenhum tratamento com DNase. Foi utilizado o kit SuperScript® IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) para a síntese de cDNA. Basicamente, o RNA total (1 µg), tanto das amostras tratadas com DNase I, Amp Grade e aquelas sem tratamento, foi transcrito reversamente em cDNA utilizando-se primers hexâmeros randômicos e 200 U
SuperScript[®] IV Reverse Transcriptase - transcriptase reversa de acordo com a metodologia recomendada pelo fabricante.

3.2.8.4 Reação de RT-PCR

Previamente à realização de RT-PCR foi realizada a otimização da temperatura de anelamento dos pares de primers. Assim, a enzima utilizada foi a GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e a determinação das temperaturas de anelamento dos primers a serem testadas foi baseada no resultado na análise das sequências com auxílio da ferramenta Tm Calculator (New England Biolabs - disponível em <u>https://tmcalculator.neb.com/#!/main</u>). As reações de PCR para otimização das temperaturas de anelamento de cada um dos pares de primers foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: 95°C por 1 min seguido por 25 ciclos de 95°C por 40 s; gradiente de temperaturas de 53°C, 55°C, 57°C, 59°C, 61°C e 63°C durante 40 s; e 72°C durante 2 min; extensão final a 72°C por 3 min. Foram utilizados 100 ng de gDNA de TC3.4.2R3 para a determinação da temperatura de anelamento dos primers em volume final de reação de cPCR de 25 µL com 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 M de cada primer, tampão 1X e 2,5 U de DNA Taq Polimerase.

Juntamente ao cDNA das linhagens (com tratamento de DNase I, Amp Grade e sem) o gDNA também foi testado no mesmo ciclo de RT-PCR, em 100 ng de gDNA de cada uma das linhagens (selvagem e mutantes). Assim, 1 µL do volume final da reação de síntese de cDNA foi utilizado para a RT-PCR em volume final de reação de PCR de 25 µL. As reações de RT-PCR foram realizadas com a GoTaq® DNA Polymerase (Promega) utilizando os seguintes parâmetros: 95°C por 1 min seguido por 25 ciclos de 95°C por 40 s; temperatura de anelamento variável de acordo com o par de primers utilizado (Tabela 3.9) por 40 s; e 72°C durante 2 min; extensão final a 72°C por 3 min. As amplificações foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante e otimizadas para cada par de primers. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose a 0,8% - 1,0% (m/v) e fotodocumentados.

3.2.9 Caracterização fenotípica de mutantes SST57 e SST58

3.2.9.1 Atividade antagônica

3.2.9.1.1 Atividade antimicrobiana do mutante de transposon M30

Foram realizados testes de antagonismo *in vitro* complementares aos que Neves (2011) havia realizado, utilizando o mutante M30 (gerado por inserção do mini-transposon Tn5) contra os seguintes fungos (coleção do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana do Departamento de Microbiologia, ICB/USP): *Rhizoctonia* sp.; *F. verticillioides*; *F. oxysporum*; *Colletotrichum* sp.; *Colletotrichum falcatum*; *Sclerotinia* sp.; *C. paradoxa*; *Rhyzopus* sp. e *Aspergillus fumigatus*, que foram cultivados a partir de discos fúngicos (2,0 cm) estocados em castelani em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) por 5 - 7 dias a 28°C.

O teste foi realizado em triplicata pelo método de pareamento em que o centro da placa de Petri foi inoculado com discos de 2,0 cm de diâmetro do patógeno e, no mesmo dia, uma das extremidades da placa foi inoculada com um repique de 3,0 cm de solução bacteriana apresentando D.O._{600nm} 1,0 (aproximadamente 10⁸ células bacterianas/mL) da linhagem bacteriana de *B. seminalis* TC3.4.2R3 ou M30. As culturas foram incubadas de 3 a 7 dias a 28°C (até o fungo atingir todas as extremidades da placa de Petri). Por se tratar de uma avaliação qualitativa, a inibição foi determinada como positiva (inibição) ou negativa (sem inibição).

3.2.9.1.2 Atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos

O teste de antagonismo semi-quantitativo foi realizado em triplicata pelo método de pareamento. Linhagens de *B. seminalis* TC3.4.2R3, SST57, SST58, LMG19587, LMG24067, LMG24271, LMG24272 e LMG24273 (Tabela 3.1) foram cultivadas em 5 mL de meio TSB líquido com adição de trimetoprima a 100 µg/mL somente para SST57 e SST58 e incubadas a 28°C por 18 horas sob agitação (200 rpm). A densidade óptica das culturas foi ajustada em meio TSB líquido para D.O._{600nm} 0,1 (aproximadamente 10⁷ células bacterianas/mL) e 5 µL dessa suspensão bacteriana foi semeada em placa contendo meio BDA (BD) em três das extremidades da placa de Petri, sendo uma delas deixada sem nenhum inóculo bacteriano (Figura 3.8) e incubadas a 28°C por 18 horas.



Figura 3.8 - Representação esquemática da metodologia utilizada para avaliar a atividade antagônica de linhagens de *B. seminalis* contra isolados de fungos (Tabela 3.10)

FONTE: Tsui (2021)

Após crescimento bacteriano, no centro da placa de Petri foi inoculado um disco de 1,0 cm de diâmetro do fungo fitopatógeno (Tabela 3.10) e novamente incubada de 7 a 14 dias a 28°C. A avaliação do teste se caracterizou em positivo (inibição) ou negativo (sem inibição).

Isolado ^a	Código⁵	Espécie	Espécie hospedeira/origem	Fonte
WLA-FP01	-	Ceratocystis fimbriata	Batata doce	Coleção LABMEM (ICB/USP)
WLA-FP02	-	Colletotrichum sp.	Citrus	Coleção LABMEM (ICB/USP)
WLA-FP03	-	Thielaviopsis paradoxa	Abacaxi	Coleção LABMEM (ICB/USP)
WLA-FP04	-	Fusarium sacchari	Cana-de-açúcar	Coleção LABMEM (ICB/USP)

Tabela 3.10 - Isolados de fungos fitopatogênicos testados

WLA-FP05	-	Fusarium verticillioides	Cana-de-açúcar	Coleção LABMEM
WLA-FP06	-	Curvularia lunata	Milho	Coleção LABMEM
WLA-FP07	007	Fusarium oxysporum fsp. vasinfectum	Algodão	EMBRAPA - Meio
WLA-FP08	Manga C	Fusarium equisetum	Manga	EMBRAPA - Meio Ambiente
WLA-FP09	CML3066	Fusarium graminearum	Trigo	EMBRAPA - Meio Ambiente
WLA-FP10	BS0208	Bipolaris sorolaniana	Trigo	EMBRAPA - Meio Ambiente
WLA-FP11	19-01	Fusarium oxysporum	Água do Rio Tietê	Coleção LABMEM (ICB/USP)
WLA-FP12	32-3	Fusarium oxysporum	Água do Rio Tietê	Coleção LABMEM (ICB/USP)
WLA-FP13	18-1	Fusarium oxysporum	Água do Rio Tietê	Coleção LABMEM (ICB/USP)
WLA-FP14	-	Fusarium oxysporium	Algodão	Coleção LGM-ESALQ
WLA-FP15	FV-01-CTC	Fusarium oxysporium	Cana de açúcar	Coleção LGM-ESALQ
WLA-FP16	T4Ø	Fusarium verticillioides	Milho	Coleção LGM-ESALQ
WLA-FP17	MMBF 913	Fusarium graminearum	Milho	Coleção do Instituto Biológico (Governo de São Paulo)
WLA-FP18	MMBF 20/95	Fusarium decemcellulare	Guaraná	Coleção do Instituto Biológico (Governo de São Paulo)
WLA-FP19	MMBF 01/96	Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici	Tomate	Coleção do Instituto Biológico (Governo de São Paulo)
WLA-FP20	MMBF 38/06	Fusarium equiseti	Pimenta	Coleção do Instituto Biológico (Governo de São Paulo)
WLA-FP21	MMBF 03/07	Fusarium oxysporum f. sp. subglutinans	Abacaxi	Coleção do Instituto Biológico (Governo de São Paulo)
WLA-FP22	MMBF 77/09	Fusarium solani	Soja	Coleção do Instituto Biológico (Governo de São Paulo)
WLA-FP23	MMBF 53/11	Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum	Algodão	Coleção do Instituto Biológico (Governo de São Paulo)
WLA-FP24	MMBF 55/11	Fusarium solani	Feijão	Coleção do Instituto Biológico (Governo de São Paulo)
WLA-FP25	MMBF 176/12	Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli	Feijão	Coleção do Instituto Biológico (Governo de São Paulo)
WLA-FP26	MMBF 248/12	Fusarium oxysporum f.sp. passiflorae	Maracujá	Coleção do Instituto Biológico (Governo de São Paulo)
WLA-FP27	MMBF 252/12	Fusarium circinatum	-	Coleção do Instituto Biológico (Governo de São Paulo)
WLA-FP28	MMBF 03/14	Fusarium solani f. sp. passiflorae	Maracujá	Coleção do Instituto Biológico (Governo de São Paulo)
WLA-FP29	-	Fusarium verticillioides	Milho	Coleção LABMEM (ICB/USP)
WLA-FP30	-	Fusarium verticillioides	Milho	Coleção LABMEM (ICB/USP)

^aOs nomes listados correspondem à identificação adotada para os fungos fitopatogênicos na coleção do laboratório do Prof. Welington Luiz de Araújo; ^bCódigos referentes aos isolados fúngicos que foram gentilmente cedidos pelas instituições listadas na coluna "Fonte". Os códigos dos isolados WLA-FP11, WLA-FP12 e WLA-FP13 referem-se à maneira como estes isolados estão identificados dentro do grupo de pesquisa que trabalha com amostras de água do Rio Tietê do Prof. Welington Luiz de Araújo

3.2.9.1.3 Atividade antagônica contra *Fusarium* spp. em duas temperaturas

Neste experimento espécies de *Fusarium* (Tabela 3.10) foram utilizadas. Para isso, culturas de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 crescidas a 28°C e 37°C foram ajustadas a D.O._{600 nm} de 0,1 e semeadas (5 µL) em meio BDA em três das extremidades da placa de Petri, sendo uma delas deixada sem nenhum inóculo bacteriano. As placas foram incubadas a 28°C e 37°C, dependendo da temperatura a ser avaliada, por 48 horas, o experimento foi conduzido em quatruplicatas para cada linhagem de *Fusarium* avaliado.

Após o período, no centro da placa de Petri foi inoculado um disco de 1,0 cm de diâmetro do fungo fitopatógeno e incubadas de 7 a 14 dias a 28°C. Placas destinadas a avaliação do antagonismo de *Burkholderia* a 37°C não foram incubadas a 37°C após inoculação do disco fúngico, pois o fungo não é capaz de crescer nessa temperatura. Após a incubação, as placas foram fotografadas e a medida do raio de crescimento fúngico foi realizada com auxílio do programa Digimizer Image Analysis Software (disponível em: <u>https://www.digimizer.com/</u>), para posterior cálculo da porcentagem de inibição [(C-T)x100/C], sendo C o diâmetro do fungo (controle - crescimento adequadro) e T o diâmetro a ser avaliado (em contato com a bactéria).

3.2.9.1.4 Antagonismo fúngico por compostos voláteis e difusíveis

Foi realizado esse experimento para avaliar se houve alteração na produção de compostos antagônicos voláteis e difusíveis pelos mutantes SST57 e SST58 comparado à linhagem selvagem. O experimento foi baseado na metodologia descrita por Spence *et al.* (2014). Apenas os fungos WLA-FP15 e WLA-FP29 (Tabela 3.10) foram utilizados neste experimento. O experimento foi conduzido nas mesmas condições de cultivo bacteriano e fúngico conforme descrito no item 3.2.9.1.3. Para a avaliação da produção de compostos antifúngicos voláteis foram utilizadas placas

contendo uma divisória, assim os discos de fungo e a bactéria foram inoculados em quadrantes separados da placa, impedindo o contato de moléculas difusíveis.

Após 14 dias de incubação, o crescimento foi avaliado para determinação da inibição e da produção de compostos antifúngicos voláteis e difusíveis na inibição dos fungos WLA-FP15 e WLA-FP29.

3.2.9.1.5 Atividade antimicrobiana de <u>B. seminalis</u> contra leveduras e bactérias patogênicas

Foi realizado o ensaio de sobrecamada (*spot on the lawn*) (HARRIS *et al.*, 1989) com algumas modificações para avaliar a atividade antimicrobiana das linhagens de *B. seminalis* contra os fungos leveduriformes *C. albicans*, e *S. cerevisiae*, e contra as bactérias patogênicas *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (Tabela 3.11).

Código	Espécie	Filo	Fonte
NCTC 3179	Candida albicans	Ascomycota	Estoque do laboratório do
			Prof. Miguel Valvano
S288C	Saccharomyces	Ascomycota	Estoque do laboratório do
	cerevisiae		Prof. Mário Henrique Barros
			(ICB/USP)
PE-2	Saccharomyces	Ascomycota	Estoque do laboratório do
	cerevisiae		Prof. Mário Henrique Barros
			(ICB/USP)
-	Staphylococcus aureus	Firmicutes	Coleção LABMEM
			(ICB/USP)
-	Pseudomonas	Proteobacteria	Coleção LABMEM
	aeruginosa		(ICB/USP)
-	Escherichia coli	Gammaproteobacteria	Coleção LABMEM
			(ICB/USP)

Tabela 3.11 - Linhagens de fungos leveduriformes e bactérias patogênicas utilizadas no ensaio de atividade antagônica de *B. seminalis* por meio do método da sobrecamada

Alíquotas de 10 µL das culturas bacterianas de *B. seminalis* TC3.4.2R3, SST57, SST58, LMG19587, LMG24067, LMG24271, LMG24272 e LMG24273 (Tabela 3.1) foram colocadas em placas contendo meio SD ágar (preparado a partir de Sabouraud Dextrose Broth - MERCK). As linhagens *C. albicans* NCTC 3179, *S.*

cereviase S288C e *S. cereviase* PE-2 (Tabela 3.11) foram inoculadas em meio SD líquido e incubadas durante 48 horas a 28°C (*S. cereviase*) e 37°C (*C. albicans*) com agitação (200 rpm). As linhagens bacterianas foram inoculadas em meio LB e incubadas a 37°C por 18 horas com agitação (200 rpm).

Após o crescimento, a cultura foi inativada 4°C por 18 horas e em seguida, 100 µL da cultura (fungo leveduriforme ou bactéria) a ser testada (*C. albicans* NCTC 3179 *S. cereviase* S288C, *S. cereviase* PE-2, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*) foram adicionados a 5 mL de ágar SD 0,8% fundido - no caso de leveduras e LBA 0,8% fundido - no caso de bactérias que foi vertido sobre a cultura inativada de *B. seminalis*. Como controle foram semeados 10 µL de meio TSB no centro das placas. O ensaio foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes. As culturas foram incubadas a 28°C (para *S. cereviase*) e 37°C (para todas as demais linhagens avaliadas) por 24 horas e a presença de um halo no entorno do inóculo bacteriano foi considerado como atividade antimicrobiana positiva contra as linhagens testadas (Figura 3.9).

Figura 3.9 - Representação esquemática da metodologia utilizada para avaliar a atividade antagônica de linhagens de *B. seminalis* contra isolados de leveduras e bactérias patogênicas listados na tabela 3.11 por meio do método de sobrecamada modificado



FONTE: Tsui (2021)

3.2.9.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Foi realizada a caracterização do perfil de susceptibilidade das linhagens de *B. seminalis* (TC3.4.2R3, SST57, SST58, LMG19587, LMG24067, LMG24271, LMG24272 e LMG24273) à diferentes antibióticos por meio do método discodifusão Kirby-Bauer (BAUER *et al.*, 1966) em meio MHA - Mueller-Hinton ágar (BD). Culturas de *B. seminalis* crescidas tiveram a D.O._{600nm} ajustada para 1,0 em meio TSB e 50 µL da suspensão foram espalhados em placas de MHA com *glass-beads*. Discos de antibióticos foram dispostos sobre as placas com o auxílio de uma pinça metálica previamente esterilizada. As placas foram incubadas a 28°C por um período de até 48 horas. Os halos de inibição, quando presentes, foram medidos e comparados entre as linhagens testadas.

Foram testados os antibióticos ampicilina (10 μg/mL), canamicina (30 μg/mL), cloranfenicol (30 μg/mL), tetraciclina (30 μg/mL), trimetoprima (5 μg/mL), polimixina (300 μg/mL), meropenen (10 μg/mL) e ceftazidima (30 μg/mL).

Também foi avaliada a sobrevivência de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 na presença de antibióticos polimixina B nas concentrações 20 µg/mL, 40 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL e 500 µg/mL, e ampicilina nas concentrações 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL e 250 µg/mL, de acordo com Lee *et al.* (2019) com algumas modificações. Brevemente, as culturas bacterianas foram ajustadas a D.O. 600nm de 0,01, a elas, forma adicionados antibióticos até a concentração testada e distribuídas em placa de 96 poços (Biofil). A culturas foram incubadas por 24 horas a 28°C, sem agitação e o crescimento avaliado por meio da determinação a D.O. 600nm. Culturas sem antibióticos foram utilizadas como controle.

3.2.9.3 Crescimento bacteriano de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e seus mutantes

A curva de crescimento realizada em placa de cultura celular de 96 poços (Biofil) com fundo chato. As linhagens bacterianas de *B. seminalis* foram préinoculadas em 5 mL de meio TSB e incubadas a 28°C por 18 horas sob agitação (200 rpm). Inicialmente, foi testado se havia diferença no crescimento bacteriano das linhagens SST57 e SST58 em meio TSB suplementado com trimetoprima (100 µg/mL) e em TSB na ausência do antimicrobiano. Os dados mostraram que o crescimento não sofreu alterações (dados não apresentados). Portanto, os experimentos foram conduzidos sem adição de trimetoprima para os mutantes insercionais.

Após o período, a D.O._{600nm} 0,01 (10⁶ UFC/mL) foi ajustada em 5 mL de meio TSB líquido para cada uma das linhagens e então, 150 μL da suspensão bacteriana foi adicionada em cada um dos poços da placa de 96. Como controle do crescimento bacteriano foi utilizando meio TSB líquido em 24 poços da placa. A curva de crescimento foi conduzida simultaneamente com 24 repetições técnicas (três colunas da placa) para cada uma das linhagens, o experimento foi repetido independentemente duas vezes. As placas de 96 poços foram incubadas a 28°C com agitação orbital constante (425 cpm) em aparelho leitor de microplacas (BioTek™ Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader), as leituras das densidades ópticas (D.O._{600nm}) foram programadas para serem coletadas no intervalo de 1 em 1 hora até totalizarem 48 horas. A curva também foi realizada seguindo a mesma metodologia, porém substituindo o meio TSB pelo meio mínimo M9 (BD Difco ™)

3.2.9.4 Motilidade bacteriana em duas temperaturas

O meio de cultura mínimo ABC (CLARK; MAALØE, 1967) foi utilizado para a realização de ensaios de motilidade bacteriana do tipo *swarming* e *swimming*. A motilidade do tipo *twitching* (ágar 1%) não foi avaliada nesse ensaio, pois resultados anteriores (não apresentados no presente documento) demonstraram que *B. seminalis* TC3.4.2R3 não realiza esse tipo de motilidade (GONÇALVES, 2017).

Assim, para o teste de *swarming* foi utilizado o meio mínimo ABC com 0,4% de ágar (m/v) e para o teste de *swimming* foi utilizado o meio ABC com 0,25% de ágar (m/v). As placas foram preparadas dentro de um fluxo laminar desligado e permaneceram secando durante 2 horas (EBERL *et al.*, 1996).

Foram aliquotados 1 mL de culturas crescidas de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 e centrifugadas para obtenção do pellet bacteriano. Para montar placas de *swimming*, uma ponteira P200 foi utilizada para encostar no pellet e então perfurar o centro da placa contendo meio mínimo ABC 0,25% ágar, o processo foi repetido para todas as réplicas. Para a montagem do experimento de motilidade do tipo *swarming*, o pellet bacteriano foi ressuspendido em 100 µL de meio LB e 5 µL dessa suspensão foram semeados no centro da placa contendo meio mínimo ABC 0,4% ágar. As culturas foram incubadas (de placas na posição "para cima") a 28°C ou 37°C por 24 horas. A motilidade foi avaliada pelo aparecimento de halos de crescimento ao redor da área de inóculo. As placas foram fotografadas e o diâmetro dos halos de crescimento foram medidos com auxílio do programa Digimizer Image Analysis Software. O experimento foi realizado em triplicata sendo realizado duas vezes de forma independente.

3.2.9.5 Produção de biofilme em duas temperaturas

A avaliação da produção de biofilme das linhagens de *B. seminalis* TC3.4.2R3, SST57, SST58 e LMG24273 foi realizada de acordo com o descrito por O'toole (2011) com algumas modificações. Assim, o ensaio foi feito em placa de cultura celular de 12 poços (Biofil) com fundo chato, em triplicatas.

Culturas crescidas das linhagens de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e seus mutantes SST57 e SST58 tiveram a D. O._{600nm} ajustada para 0,01 (10⁶ UFC/mL) e 2 mL dessa solução bacteriana foram adicionados aos poços da placa. As placas foram incubadas sem agitação a 28°C e 37°C por 48 horas, visando avaliar a diferença na produção de biofilme nessas duas temperaturas.

Após o período de incubação, a cultura bacteriana crescida foi removida dos poços e os poços lavados 3x com água destilada. Após remoção de água destilada residual a placa foi incubada a 60°C por 20 minutos para secagem e 2,5mL do corante cristal violeta 0,1% (m/v) foram adicionados a cada um dos poços e incubado a temperatura ambiente por 30 min com agitação de 150 rpm. Após o período, a placa foi novamente lavada com água destilada e secada a 60°C por 1 hora, somente então no momento da leitura da placa foram adicionados 2 mL de etanol 95% para solubilizar o cristal violeta retido (o biofilme). A leitura foi feita em D.O._{595nm} em aparelho leitor de microplacas (BioTek[™] Epoch Microplate Spectrophotometer).

3.2.9.6 Detecção de produção de AHL

A detecção de produção de n-acil homoserina lactonas (AHL), substância autoindutora do *quorum sensing* (QS) em Gram-negativas foi realizada por meio da utilização da linhagem *Chromobacterium violaceum* CV026 (gentilmente cedida pelo Prof. Leo Eberl, Universidade de Zurique), mutante incapaz de produzir o composto violaceína.

A metodologia utilizada para esse ensaio foi a mesma descrita por Torres *et al.* (2013) com algumas modificações. Basicamente, a linhagem CV026 foi crescida (5 mL) a 32°C por 18 horas sob agitação (200 rpm) e 500 µL dessa cultura foram adicionados a 5 mL de meio semi-sólido fundente LBA (0,8% ágar) e colocados sobre meio LBA (20 mL). Após solidificação, foram feitos furos em posições

conhecidas nas placas com auxílio da base de uma ponteira P200 estéril. Culturas de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 crescidas foram centrifugadas, obtendo-se apenas o extrato da cultura (sobrenadante da centrifugação).

Dentro do furo das placas de LBA contendo CV026 foram colocados 20 µL de extrato das culturas a serem testadas, TC3.4.2R3, SST57 e SST58. Além disseo, fez-se um controle negativo utilizando 20 µL de meio LB e um controle positivo, utilizando 50 µL um composto de AHL sintético, o OdDHL (N-3- Oxidodecanoyl - L - homoserine-lactona) (SIGMA) na concentração de 50 µg/mL. As placas foram incubadas a 32°C por 48 horas. O aparecimento de um halo de cor roxa (violaceína) em volta do furo indica detecção de AHL. O experimento foi realizado em triplicatas.

3.2.9.7 Avaliação de tolerância a estresses ambientais

A metodologia utilizada para avaliação da relação dos genes do n-TASE cluster com adaptações a estresses ambientais foi baseada em Lee *et al.* (2019). Foi avaliada a tolerância de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 frente a estresses do tipo ácido, osmótico, salino e a detergente.

A tolerância ao estresse osmótico foi realizada pela incubação de culturas de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 ajustadas para a D.O._{600nm} de 0,1 com 20% D-sorbitol por 40 min a 28°C. Após a incubação, diluições seriadas da solução com D-sorbitol foram realizadas até a diluição 10⁻⁵ e semeadas em meio LBA em quatruplicatas por *drop-plate* (30 μL). As culturas foram incubadas a 28°C por 48 horas para contagem de UFCs. A tolerância ao estresse a detergente foi realizada da mesma maneira, incubando as culturas ajustadas a D.O._{600nm} de 0,1 com 0,01% SDS por 10 min a 28°C, a avaliação da tolerância ao SDS se deu pela contagem de UFCs.

A tolerância ao estresse salino foi avaliada por meio de placas contendo LBA com 1,5% de NaCl, culturas bacterianas ajustadas a D.O._{600nm} de 0,1 foram diluídas seriadamente até a diluição 10⁻¹², e as diluições (10⁻⁴ a 10⁻¹²) semeadas por *dropplate* em quadruplicata sobre meio LBA, incubadas a 28°C por 48horas. A tolerância ao estresse ácido foi realizada da mesma maneira, utilizando meio LBA com pH ajustado para 4,5, sobre as quais foram semeadas as mesmas diluições para controle positivo de crescimento. A contagem de UFCs foi realizada para avaliação de tolerância.

A análise estatística da tolerância a esses tipos de estresses ambientais foi realizada utilizando a porcentagem de sobreviviência das culturas bacterianas em cada uma das diferentes situações (estresse ácido, salino, osmótico e detergente), em relação ao controle (LB - sem estresse).

3.2.9.6.1 Estresse oxidativo induzido por H₂O₂

(i) Experimento 1

A avaliação da tolerância ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) também foi realizada baseando-se na metodologia descrita por Lee *et al.* (2019) para *B. glumae*. Inicialmente, culturas de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 foram ajustadas a D.O._{600nm} de 0,1 e 100 μ L dessa cultura foram semeados sobre meio LBA, após secagem, discos de papel submersos, previamente, em H₂O₂9,8M (sem diluição) foram colocados sobre as placas com cultura bacteriana e incubadas a 28°C por 48horas.

(ii) Experimento 2

O não crescimento bacteriano levou a adaptação dessa metodologia de avaliação. Assim ao invés de submergir os discos em H_2O_2 sem qualquer diluição (9,8M), as seguintes concentrações foram testadas: 0,005 mM, 0,05 mM, 0,5 mM, 5 mM, 50 mM, 500 mM e 5000 mM. Além disso, discos submersos apenas em meio LB foram utilizados para controle do experimento. O experimento foi realizado a 28°C por 48 horas, a medição do halo no entorno dos discos de H_2O_2 ("halo de inibição de crescimento") foi realizada para avaliação da tolerância ao estresse oxidativo. Esse experimento foi conduzido em quatruplicatas.

(iii) Experimento 3

Além dessa metodologia em placas contendo meio sólido, também foi realizada uma avaliação de tolerância ao estresse oxidativo, incubando-se culturas ajustadas de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 a D.O._{600nm} de 0,01 com diferentes concentrações de H₂O₂: 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M, 600 μ M, 700 μ M, 800 μ M, 900 μ M, 1000 μ M, 1500 μ M e 2000 μ M, bem como controle com meio LB (sem H₂O₂) durante 40 min a 28°C. Foram utilizadas duas placas de 24 poços para a incubação, cada poço apresentava uma concentração diferente de H₂O₂. Após o período, diluições seriadas de cada cultura nas diferentes concentrações foram

realizadas (utilizando placas de 96 poços), apenas as diluições 10^{-10} , 10^{-11} e 10^{-12} foram plaqueadas por *drop-plate* (30 µL) em placas de LBA. O controle com LB também foi semeado nessas diluições e incubadas 28°C por 48 horas para contagem de UFCs, como forma de avaliar a tolerância ao H₂O₂. Esse experimento foi realizado três vezes, independentemente. A análise estatística desse experimento foi realizada utilizando a porcentagem de sobreviviência das culturas bacterianas em cada uma das diferentes concentrações testadas, em relação ao controle (LB sem adição nenhuma de H₂O₂).

3.2.9.7 Produção de toxoflavinas

A produção de toxoflavinas pelas linhagens TC3.4.2R3 e mutantes SST57 e SST58 foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Chen *et al.* (2012) para *B. glumae*. Culturas bacterianas foram crescidas por 18 horas a 28°C sob agitação constante (200 rpm), e 1 mL da suspensão bacteriana foi centrifugado a 16.000xg por 1 min, o sobrenadante foi filtrado utilizando seringa e filtro (Millipore 0,22 µm de 33 mm de diâmetro) e então esse sobrenadante livre de células (*cell free supernatant*) foi extraído três vezes com 1 mL de clorofórmio. Por fim, após a evaporação do clorofórmio (24 horas após extração), o material residual dentro do microtubo foi ressuspendido com 1 mL de metanol 80%. Fez-se a medição de absorbância a 393 nm para determinar a quantidade de toxoflavina produzida. O experimento foi conduzido em triplicata e três vezes, independentemente

3.2.9.8 Interação com *B. gladioli* ORQF-04F, causadora de necrose foliar em *Oncidium* Aloha Iwanaga

3.2.9.8.1 Avaliação da atividade antagônica de B. seminalis contra B. gladioli ORQF-04F por meio de metodologia cross-streak

A atividade antagônica TC3.4.2R3, SST57 e SST58 foi avaliada pela metodologia *cross-streak* (RAHMAN *et al.*, 2011). A D.O._{600nm} da cultura crescida das linhagens foi ajustada para 1,0 (10⁸ UFC/mL), cada uma delas foi estriada em placas contendo meio TSA e incubadas por 24 horas a 28°C. Após esse período, uma suspensão bacteriana de *B. gladioli* ORQF-04F também ajustada a D.O._{600nm} de 1,0 foi estriada em placas de TSA já com a linhagem de *B. seminalis* crescida a um

ângulo de 90° em um total de três estrias em cada um dos lados da estria de *B. seminalis* (Figura 3.10) e incubadas por 48 horas a 28°C. O ensaio foi realizado em triplicatas em dois experimentos independentes. O efeito antagônico de *B. seminalis* sob *B. gladioli* foi avaliado pela determinação do tamanho da zona de inibição.

Figura 3.10 - Metodologia *cross-streak* para teste de atividade antagônica de linhagens de *B. seminalis* contra o agente causador de necrose foliar de orquídea, *B. gladioli* ORQF-04F. **A.** *B. seminalis* cultivada e com D.O._{600nm} ajustada para 1,0 foi estriada em placas de TSA e incubadas por a 28°C por 24 horas; **B.** Após o crescimento, três estrias de *B. gladioli* com ângulo de 90° da estria de *B. seminalis* foram feitas para cada um dos lados da placa, as placas foram incubadas a 28°C por 24 horas



FONTE: Tsui (2021)

3.2.9.8.2 Avaliação da atividade antagônica de B. seminalis contra B. gladioli ORQF-04F por meio de metodologia spot-on-the-lawn

Foi realizado o ensaio de sobrecamada (*spot-on-the-lawn*) descrita inicialmente por Harris *et al.* (1989) com modificações para avaliar a atividade antimicrobiana das linhagens de *B. seminalis* contra *Burkholderia gladioli* ORQF-04F, semelhante ao que foi realizado com bactérias patogênicas e fungos leveduriformes (item 3.2.9.1.5). As linhagens de *B. seminalis* foram inoculadas em 5 mL de meio TSB líquido e incubadas a 28°C por 18 horas com agitação (200 rpm). Alíquotas de 10 µl do cultivo bacteriano crescido de cada linhagem de *B. seminalis* avaliada foram colocadas em placas contendo meio TSA em triplicata e incubadas a 28°C por 18 horas. Após o crescimento das linhagens de *B. seminalis*, as placas foram incubadas a baixa temperatura (4°C) por 18 horas a fim de inativá-las. A *B. gladioli* foi inoculada em 5 mL de meio TSB líquido e incubada a 28°C por 18 horas com agitação (200 rpm). Em seguida, 100 μ L da cultura de *B. gladioli* ORQF-04F foram adicionados a 5 mL de TSA 0,8% (m/v) fundido que foi vertido sobre a cultura inativada das linhagens de *B. seminalis* e incubadas a 28°C por 18 horas. A presença de um halo >1mm no entorno da cultura inativada foi considerado como atividade antimicrobiana positiva. Os dados foram posteriormente tratados pelo Teste *t Student* (duas amostras independentes), com nível sendo P<0,05 considerado significativo.

3.2.9.8.3 Avaliação da atividade antagônica de B. seminalis contra B. gladioli ORQF-04F por meio do controle necrose foliar de orquídea

A avaliação da capacidade de controle de sintomas de necrose foliar em orquídea por linhagens de *B. seminalis* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Araújo *et al.* (2016), com algumas modificações. Culturas crescidas por 24 horas a 28°C de TC3.4.2R3, SST57 e SST58, bem como *B. gladioli* ORQF-04F tiveram a D.O._{600nm} ajustada para 0,01 (10⁶UFC/mL) em PBS ao volume final de 1 mL. Posteriormente, 500 µL de cada uma das linhagens de *B. seminalis* a D.O._{600nm} 0,01 foram adicionados a 500 µL de *B. gladioli* também a D.O._{600nm} 0,01. A partir de então, 5 µL de cada mistura a ser testada foram semeados sobre um fragmento foliar de orquídea (*Oncidium* Aloha Iwanaga) de 2 x 2 cm, previamente perfurados com uma ponteira de plástico esterilizada e incubados em câmera úmida a 28°C por 3 dias. Um dos fragmentos foi inculado apenas com 500 µL de *B. gladioli* (controle positivo de formação de sintomas de necrose). O experimento foi conduzido em triplicatas. A avaliação desse experimento foi qualitativa (controle positivo ou negativo).

3.2.9.9 Extração de LPS e análise por eletroforese em gel de SDSpoliacrilamida

As oito linhagens de *B. seminalis* TC3.4.2R3, SST57, SST58, LMG19587, LMG24067, LMG24271, LMG24272 e LMG24273 (Tabela 3.1) foram cultivadas em

5 mL de meio LB líquido com adição de trimetoprima a 100 μg/mL somente para SST57 e SST58 e incubadas a 30°C por 18 horas sob agitação (200 rpm). A extração de lipopolissacarídeo foi realizada de acordo com Marolda *et al.* (2006) e o perfil de corrida de LPS foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com sistema Tricina-SDS (MAROLDA *et al.,* 2006).

3.2.9.10 Infecção em Galleria mellonella

Lagartas de *G. mellonella* utilizadas no presente estudo foram provenientes da própria criação que foi iniciada em março de 2017 pela Dra. Priscila Jane Romano de Oliveira Gonçalves (Processo FAPESP N°.: 2013/03426-9) e permanece até o presente momento no laboratório.

3.2.9.10.1 Determinação de carga bacteriana para experimento de infecção de G. mellonella

Cinco grupos de 10 lagartas no último ínstar (25 - 30 mm e 200 - 250 mg) foram separadas e colocadas em placas de Petri (150 x 90 mm²) contendo 1,5 g de pólen de flores e um pedaço de cera alveolada de abelha (2 cm x 8 cm ou 4 cm x 4 cm). Apenas lagartas aparentemente saudáveis, sem sinais de melanização e com movimentação e resposta rápida a estímulos externos foram selecionadas para serem usadas nos experimentos de infecção. As placas contendo lagartas foram incubadas a 28°C por 24 horas antes da injeção bacteriana. Assim, no dia da injeção, as placas contendo *G. mellonella* foram colocadas a 4°C, 1 hora antes do processo de injeção.

Foram realizados dois experimentos para determinação da concentração mínima para causar mortalidade de 50% das lagartas, inicialmente foi realizado o experimento 1, utilizando diferentes valores de densidade ótica (D.O._{600nm}) sendo, 0,1; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0. Como esse método não permitiu diferenciar a taxa de mortalidade de *G. mellonella* causada por TC3.4.2R3, o experimento 2 foi conduzido, utilizando diferentes diluições (10⁻¹ até 10⁻⁷) de suspensões bacterianas a partir de D.O._{600nm} 1,0 (10⁸ UFC/mL).

(i) Experimento 1

A determinação da concentração mínima para causar mortalidade de 50% das lagartas testadas foi realizada utilizando diferentes concentrações de TC3.4.2R3 determinadas pela medição da densidade ótica (D.O._{600nm})sendo, 0,1; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0. A *B. seminalis* TC3.4.2R3 foi inoculada em 5 mL de meio TSB líquido e incubada a 28°C por 18 horas sob agitação constante (200 rpm). Após o período, a cultura bacteriana foi centrifugada a 1.900xg por 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o pellet bacteriano foi ressuspendido em tampão 5 mL de PBS.

A determinação da densidade ótica (D.O._{600nm}) da cultura bacteriana foi realizada em espectrofotômetro e diluições para se obter as suspensões bacterianas nas seguintes concentrações de D.O._{600nm} 0,1; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0 foram realizadas. Foram utilizadas 10 lagartas por tratamento (diferentes concentrações de TC3.4.2R3).

A inoculação de *B. seminalis* TC3.4.2R3 em *G. mellonella* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Harding *et al.* (2013) com algumas modificações, em que foi realizada a injeção de 10 µL das suspensões bacterianas (D.O._{600nm} 0,1; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0) em cada uma das lagartas através da penúltima *proleg* direita de *G. mellonella*, com auxílio de seringa de volume de 20 µL Hamilton. Foram utilizados como controles, uma placa contendo 10 lagartas sem nenhum inóculo e outra placa contendo 10 lagartas inoculadas com 10 µL de PBS (Figura 3.11).

Figura 3.11 - Experimento de infecção de *G. mellonella* com TC3.4.2R3 e seus mutantes. Cinco grupos de 10 lagartas no último instar (25 - 30 mm e 200 - 250 mg) foram separadas e colocadas em placas de Petri (150 x 90 mm²) contendo 1,5g de pólen de flor e um pedaço de cera alveolada de abelha (4 cm x 4 cm). Apenas lagartas aparentemente saudáveis, sem sinais de melanização e com movimentação e resposta rápida a estímulos externos foram selecionadas para serem usadas nos experimentos de infecção



FONTE: Tsui (2021)

Após as injeções, as lagartas foram incubadas a 28°C e a cada 24 horas, foram observadas e avaliadas quanto a mortalidade ou sobrevivência. O experimento foi conduzido uma única vez. As lagartas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhuma resposta ao toque ou quando apresentaram pigmentação escura. A morte de todas as lagartas do grupo experimental ou a transição para a forma de pupa determinou o término do experimento.

(ii) Experimento 2

Devido à morte de lagartas de todas as suspensões bacterianas testadas na descrição acima (considando a D.O._{600nm}), um segundo teste foi realizado utilizando diluições seriadas de 10⁻¹ até 10⁻⁷ a partir de uma cultura crescida de TC3.4.2R3 ajustada a D.O._{600nm} de 1,0 (10⁸ UFC/mL). A metodologia utilizada foi a mesma descrita acima, utilizando 10 µL das suspensões bacterianas nas diluições mencionadas. Cada diluição foi testada com 10 lagartas no último ínstar.

3.2.9.10.2 Infecção de G. mellonella com B. seminalis TC3.4.2R3 e mutantes

As linhagens de *B. seminalis* TC3.4.2R3, SST57 e SST58 foram inoculadas em 5 mL de meio TSB líquido e incubadas a 28°C por 18 horas com agitação (200 rpm). Após o crescimento, a cultura bacteriana foi centrifugada a 16.000xg por 5 minutos a temperatura ambiente e ressuspendida em tampão PBS, a D.O._{600nm} foi ajustada para 1,0 (10⁸ UFC/mL) em PBS ao volume final de 1 mL. A partir desta suspensão bacteriana de D.O._{600nm} 1,0, foram feitas diluições seriadas e a diluição de 10⁻⁶ foi utilizada para inocular nas lagartas de *G. mellonella*. A inoculação de *B. seminalis* TC3.4.2R3 em *G. mellonella* foi realizada de acordo com a metodologia descrita acima.

Cada tratamento foi realizado com 10 lagartas, foram utilizados como controles, uma placa contendo 10 lagartas sem nenhum inóculo e outra placa contendo 10 lagartas inoculadas com 10 µL de PBS (Figura 3.11). Após as injeções, as lagartas foram incubadas a 28°C por 120 horas para permitir a progressão da infecção de *B. seminalis*. A cada 24 horas, durante 5 dias, as lagartas foram observadas e avaliadas quanto a mortalidade ou sobrevivência. As lagartas foram determinadas como mortas quando não respondiam com movimento do corpo a estímulos externos e quando a superfície do corpo da lagarta apresentava pigmentação escura devido à melanização. O experimento foi conduzido de forma independente seis vezes.

3.2.9.10.3 Experimento piloto para extração de hemolinfa

A avaliação de sobrevivência das linhagens bacterianas na hemolinfa foi realizada baseada na metodologia de extração de hemolinfa descrita por Harding *et al.* (2013). A montagem do experimento de infecção se procede da mesma maneira conforme descrito no item acima (3.2.9.10.2). São necessárias três lagartas para uma amostra de hemolinfa por tratamento (diferentes *timepoints* - tempo após infecção bacteriana) (Figura 3.12).

Inicialmente, para verificar se a extração de hemolinfa seria possível e se bactérias isoladas seriam realmente da linhagem TC3.4.2R3, foi conduzido um experimento piloto (infectando *G. mellonella* somente com a linhagem selvagem TC3.4.2R3) para extração de hemolinfa e isolamento bacteriano a partir dela. Foram avaliados 3 *timepoints*, 1 h.a.i. (hora após infecção), 6 h.a.i. e 24 h.a.i., dessa forma foram 10 lagartas por *timepoint* avaliado, para obter triplicatas de hemolinfa (Figura 3.12).

Figura 3.12 - Representação esquemática de tratamento infecção de *G. mellonella* com TC3.4.2R3, extração de hemolinfa do *timepoint* 1 h.a.i. Três lagartas compõem uma réplica de hemolinfa, a extração de hemolinfa foi realizada em triplicatas





Microtubos contendo 50 µL de ácido ascórbico (1 mg/mL) foram preparados e mantidos no gelo até sua utilização. As lagartas foram dispostas em tubos de 5 mL e acondicionadas em gelo, com uma lâmina de bisturi, um corte preciso e raso é feito na parte seccionada logo após a última proleg (Figura 3.13). Uma pequena pressão foi feita no corpo da larva para que o conteúdo da hemolinfa saia rapidamente (não é recomendado utilizar a hemolinfa após 10 min de extração), uma pipeta P200 foi utilizada para recuperar todo o conteúdo e transferir para o microtubo contendo ácido ascórbico no gelo. O processo foi repetido com as duas lagartas restantes da réplica de hemolinfa, obtendo-se aproximadamente 100 µL de hemolinfa.

Figura 3.13 - Local de corte para extração de hemolinfa. Na imagem à esquerda, está ilustrada a montagem com uma ponteira P1000 para facilitar o manuseio da larva. Na imagem à direita, a seta vermelha destaca uma gotinha de hemolinfa (amarelo translúcido) saindo do corte. Essa gotinha pode ser recuperada com auxílio de uma pipeta P200



FONTE: Tsui (2021)

As lagartas dos tratamentos com PBS e controle (sem injeção) foram também utilizados para extração de hemolinfa e isolamento bacteriano no último *timepoint* desse experimento (24 h.a.i.). A hemolinfa coletada em *timepoints* até 24 horas após infecção foi diretamente semeada em meio LBA suplementado com antibiótico (espectinomicina 300 µg/mL).

A confirmação da identidade bacteriana de TC3.4.2R3 foi realizada por PCR utilizando os primers RT-PCR_2858_Fw e RT-PCR_2858_Rv (Tabela 3.9), assim 8 colônias que cresceram em LBA com espectinomicina (300 µg/mL) foram selecionadas de cada *timepoint*, e foi realizada PCR de colônia utilizando a enzima GoTaq Polimerase (Promega) para verificação dessas colônias (item 3.2.3), de acordo com as especificações do fabricante com as seguintes condições de reação: 95°C por 1 min seguido por 25 ciclos de 95°C por 40 s; 63°C durante 40 s; e 72°C durante 2 min; extensão final a 72°C por 3 min.

3.2.9.10.4 Sobrevivência bacteriana em hemolinfa

A comparação da sobrevivência bacteriana das linhagens de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 foi realizada com a extração e isolamento bacteriano de hemolinfa dos seguintes *timepoints*: 1 h.a.i., 6 h.a.i., 12 h.a.i., 24 h.a.i. e 48 h.a.i., utilizando a mesma metodologia descrita acima no teste piloto para extração e isolamento bacteriano de hemolinfa. O experimento foi realizado uma única vez e em triplicatas. A hemolinfa extraída foi semeada diretamente em meio LBA suplementado com espectinomicina (300 µg/mL), para os timepoints de 24 h.a.i. e 48 h.a.i. foi realizada a diluição de 1:10 e 1:100 com ácido ascórbico (1 mg/mL) para a contagem de UFCs após 48 horas de incubação a 28°C.

3.2.9.10.5 Detecção bacteriana por PCR

Foi realizada a extração de DNA total de lagartas de *G. mellonella* após infecção bacteriana 24 h.a.i. e 72 h.a.i. para verificar se é possível a recuperação de material genético bacteriano dessas lagartas. Três lagartas foram maceradas com nitrogênio líquido e 50 mg do macerado foi utilizado para a extração de gDNA (kit PROMEGA). Para cada tratamento (TC3.4.2R3, SST57 e SST58 lagartas vivas 24 h.a.i. e TC3.4.2R3, SST57 e SST58 lagartas mortas 72 h.a.i.) foram realizadas três réplicas,

cada uma composta pelo macerado de três lagartas que tiveram o seu peso avaliado antes. Também foram utililizadas lagartas do controle (sem infecção) e inoculação com tampão PBS vivas de 24 h.a.i., como controle.

O gDNA extraído de lagartas infectadas com TC3.4.2R3 e SST57 (vivas e mortas), bem como os tratamentos controles PBS e controle (sem injeção) foi utilizado para realização de PCR com os primers RT-PCR_2858_Fw e RT-PCR_2858_Rv (Tabela 3.9), para o gDNA extraído das lagartas infectadas com SST58 (vivas e mortas) foram utilizados os primers RT-PCR_2857_Fw e RT-PCR_2857_Rv (Tabela 3.9). As reações foram realizadas utilizando a enzima Go Taq Polimerase (item 3.2.3), de acordo com as especificações do fabricante com as seguintes condições de reação: 95°C por 1 min seguido por 25 ciclos de 95°C por 40 s; Ta (°C) indicada na tabela 3.9 para cada um dos pares de primers durante 40 s; e 72°C durante 2 min; extensão final a 72°C por 3 min. Esse teste foi realizado a fim de se verificar a possível recuperação de material genético bacteriano a partir de lagartas pós experimento, e potencial utilização desse material para avaliação de infecção bacteriana por qPCR, utilizando os primers testados na PCR comum.

3.2.11 Análise estatística

Todas as análises *in vitro* foram realizadas em (pelo menos) triplicatas, com subsequente análise estatística por ANOVA One-way com teste de Tukey (GraphPad Prism 5) e comparações múltiplas com P<0.05 considerado significativo. A curva de sobrevivência de Kaplan-Meier com teste de log-rank (Mantel-Cox) e correção de Bonferroni (GraphPad Prism 5) foi utilizada para comparar a sobrevivência de lagartas de *G. mellonella*.

3.3 Resultados

3.3.1 Teste de resistência a antibióticos

B. seminalis TC3.4.2R3 foi sensível apenas aos antibióticos, cloranfenciol, canamicina e espectinomicina nas concentrações mínimas de 10 μg/mL, 50 μg/mL e 150 μg/mL, respectivamente (Tabela 3.12).

Tabela 3.12 - Resultados obtidos com os testes de susceptibilidade aos antibióticos cloranfenicol, tetraciclina, ampicilina, canamicina e espectinomicina em diferentes concentrações

Antibiótico testado	TC3.4.2R3
e concentrações	
<u>(µg/ml)</u>	
0	+
	-
5U 100	-
100	-
200	-
250	_
Trimetroprima	
0	+
10	+
50	_
100	-
150	-
200	-
200	-
250	-
Ampicilina	
0	+
10	+
50	+
100	+
150	+
200	+
250	+
Gentamicina	
0	+
10	+
50	+
100	+
150	+
200	+
ZOU Delimining D	+
10	+
50	+
100	+
150	+
200	т -
250	_
Canamicina	
0	+
10	+
50	+
100	+
150	+
200	-
250	-
Tetraciclina	

0	+	
10	+	
50	+	
100	-	
150	-	
200	-	
250	-	
250	-	
Espectinomicina		
0	+	
10	+	
50	+	
100	+	
150	-	
200	-	
250		

(+) houve crescimento bacteriano na concentração utilizada

(-) não houve crescimento bacteriano na concentração utilizada

A resistência ao cloranfenicol foi selecionada para o teste com o sistema CRISPR/Cas9 (gene CmR), primeiramente por ser o antibiótico já utilizado pelo grupo para demais aplicações moleculares, e também por ter apresentado a menor concentração inibitória para *B. seminalis* TC3.4.2R3 (10 μg/mL - Tabela 3.12).

Para os demais experimentos do presente estudo, quando necessário, os antibióticos canamicina (300 μ g/mL), cloranfenicol (60 μ g/mL), espectinomicina (300 μ g/mL) e trimetoprima (100 μ g/mL) foram adicionados ao meio de cultura.

3.3.2. Métodos de obtenção de mutantes de B. seminalis TC3.4.2R3

3.3.2.1 *Splicing by overlapping extension* (SOEing) PCR

O 1° round de PCRs permitiu a obtenção fragmentos upstream (990 bp), e downstream (984 bp) para o gene Bsem_02857; upstream (956 bp) e downstream (982 bp) para o gene Bsem_02858; upstream (967 bp) e downstream (968 bp) para o gene Bsem_02859 e upstream (992 bp) e downstream (969 bp) para o gene Bsem_02860, além do fragmentos do gene de resistência ao cloranfenicol (Figura 3.14A).

A obtenção do cassete de mutagênese por meio do 2° *round* de PCR foi mais complicada, especialmente para a junção dos fragmentos dos genes Bsem_02857 e Bsem_02858. Todas as junções foram possíveis em algum momento do desenvolvimento da presente metodologia (Figura 3.14B), no entanto, a repetição da PCR para conseguir novamente a junção e para obter maior volume de material não era uniforme entre as reações. Como se pode observar na figura 3.14B, as bandas que se encontram na altura de 3 Kb, geralmente são muito fracas e após purificação dessas bandas do gel de agarose, a concentração de DNA dificilmente ultrapassou 20 ng/µL. Além disso, alguns produtos de PCR apresentavam maior concentração de DNA em bandas intermediárias (tamanho de 2Kb), provavelmente devido à junção dos fragmentos *upstream* e cloranfenicol ou *downstream* e cloranfenicol.

Figura 3.14 - Produtos de PCR obtidos para a construção do cassete de mutagênse **A.** Produtos gerados pelo1° *round* de PCR, M - marcador molecular 1Kb plus, 1, 2, 3 - fragmentos *upstream*, cloranfenicol e *downstream* do gene Bsem_02858; 4,5,6 - fragmentos *upstream*, cloranfenicol e *downstream* do gene Bsem_02857; 7,8,9 - fragmentos *upstream*, cloranfenicol e *downstream* do gene Bsem_028590; 10,11,12 - fragmentos *upstream*, cloranfenicol e *downstream* do gene Bsem_02860. **B.** Produtos gerados pelo 2° *round* de PCR, M - marcador molecular 1Kb ou 1Kb plus, 1 - junção dos fragmentos *upstream*, cloranfenicol e *downstream* do gene Bsem_02858; 2,3 - junção dos fragmentos *upstream*, cloranfenicol e *downstream* do gene Bsem_02857 e Bsem_02860, respectitvamente; 4 - junção dos fragmentos *upstream*, cloranfenicol e *downstream* do gene Bsem_02859







Não foi possível dar continuidade a esse método de mutagênese devido à indisponibilidade de tempo e à imprevisibilidade do sucesso no 2° *round* de PCR. Além disso, foi observado que apenas a enzima ExTaq DNA polimerase permitiu a junção dos fragmentos dentre as inúmeras tentativas. Outras enzimas DNA polimerase do tipo *high-fidelity* foram testadas (Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, OneTaq® DNA Polymerase e Pfu DNA Polymerase), porém todas sem sucesso para essa etapa da junção (dados não apresentados). A metodologia de SOEing PCR não foi continuada e as etapas seguintes (digestão com *Xbal/Hind*III e ligação em pEx18Km) não foram realizadas.

3.3.2.2 In-Fusion Cloning

A obtenção dos fragmentos para construção do vetor de mutagênese pEx_Bs2858 via PCR foi atingida com êxito. Os fragmentos *upstream*, cloranfenicol e *downstream* de 987 pb, 926 pb e 967 pb (Figura 3.15), respectivamente, foram purificados do gel de agarose e utilizados na reação do sistema In-Fusion Cloning. No entanto, a transformação de células competentes de *E. coli* DH10B (ao todo foram quatro tentativas com a mesma reação de In-Fusion – 10 μL) não originou nenhuma colônia transformante. Não foi observado nenhum crescimento bacteriano. Outras tentativas de junção do vetor linearizado e fragmentos de PCR não foram realizadas, portanto, a geração de mutantes para o gene da metiltransferase Bsem_02858 em TC3.4.2R3 com In-Fusion Cloning também não foi possível.

Figura 3.15 - Produtos de PCR obtidos para a construção do cassete de mutagênese via In-Fusion Cloning. M - marcador molecular 1Kb, 1 - fragmento *upstream*, 2 - fragmento cloranfenicol e 3 fragmento *downstream* do gene Bsem_02858



FONTE: Tsui (2021)

3.3.6.3 CRISPR/Cas9

3.3.6.3.1 Vetor all-in-one pSF

A transformação do vetor pSF com células eletrocompetentes de *E. coli* DH5a apresentou eficiência de 10⁸ UFC/µg de DNA. Já a transformação de pSF em células eletrocompetentes de TC3.4.2R3 apresentou uma eficência de 10⁶ UFC/µg de DNA. O controle negativo constituído por células de TC3.4.2R3 transformadas com água Milli-Q não resultou em transformantes, indicando que o gene marcador de resistência está funcionando para a seleção de transformantes de TC3.4.2R3 (Figura 3.16).

Figura 3.16 - Obtenção de transformantes de **A.** *E. coli* DH5α; **B.** *B. seminalis* TC3.4.2R3 por meio da eletroporação com o vetor pSF e **C.** controle negativo, constituído por transformação de TC3.4.2R3 com água Milli-Q, células transformadas foram inoculadas em meio LBA suplementado com antibiótico cloranfenicol (60 μg/mL)



FONTE: Tsui (2021)

Células transformantes de *E. coli* DH5α foram submetidas a extração de plasmídeo que foi utilizado para realização de PCR com os primers que anelam no gene de resistência ao cloranfenicol (MTase03 e MTase04), juntamente ao vetor pSF que foi originalmente utilizado nas transformaçõs bacterianas, para confirmação de inserção do vetor nas células. Ambas amostras de pSF geraram produtos de PCR com o tamanho esperado de aproximadamnte 1 Kb (Figura 3.17), indicando que houve a inserção do vetor *all-in-one* em *E. coli* DH5a.

Figura 3.17 - Confirmação de inserção do vetor pSF em células de *E. coli* DH5α. M - marcador molecular 1Kb; 1 - produto de PCR do vetor pSF e 2 - produto de PCR utilizando plasmídeo extraído de célula transformante de *E. coli* DH5α com o vetor all-in-one



FONTE: Tsui (2021)

As colônias resultantes da transformação de pSF em TC3.4.2R3 eletrocompetentes não apresentaram o tamanho de fragmento de PCR correspondente a um evento de deleção (do gene Bsem_02858) seguida de reparo de DNA (equivalente a 1.974 pb). Todos os produtos de PCR apresentaram o mesmo tamanho do fragmento do gene Bsem_02858 selvagem, 2.387 pb. Todos eles apresentaram um produto de PCR de aproximadamente 2,5 Kb. Nenhum mutante positivo CRISPR/Cas9 foi obtido pela transformação de TC3.4.2R3 com o vetor pSF *all-in-one* (Figura 3.18).

Figura 3.18 – Produtos de PCR realizada com primers MTase01 e MTase06. M - marcador molecular 1Kb; B – controle negativo da PCR composto pela amplificação da água Milli-Q; 1-14 – produtos de PCR utilizando gDNA células de TC3.4.2R3 transformadas com pSF; 15 e 16 – produtos de PCR originados através de *B. seminalis* TC3.4.2R3 de DNA de tipo selvagem



FONTE: Tsui (2021)

Com o objetivo de aumentar as chances de uma transformação positiva, o processo foi repetido duas vezes após esses resultados, nenhum deles gerou mutantes CRISPR/Cas9 positivos (via confirmação por PCR de colônia de todas as colônias que cresceram na placa). A última eletrotransformação rendeu apenas 4 UFCs em 100 µL de células transformadas, indicando que podem ser células resistentes ao antibiótico cloranfenicol, e não mutantes CRISPR/Cas9. A geração de mutantes livres de cicatrizes de TC3.4.2R2 pela metodologia CRISPR/Cas9com vetor pSF não foi possível.

3.3.6.3.1.1 Avaliação de células eletrocompetentes

A eficiência de transformação do vetor pBBR1MCS com as células de *B. seminalis* TC3.4.2R3 eletrocompetentes foi de 1,48 x 10⁷ CFU/µg de DNA. Indicando que TC3.4.2R3 eletrocompetentes são viáveis para receber o vetor. Não sendo o processo de transformação por choque elétrico em TC3.4.2R3 eletrocompetentes a razão da não obtenção de mutantes do gene Bsem_02858 via CRISPR/Cas9 utilizando o vetor *all-in-one* pSF, especialmente sintetizado para esse gene nessa linhagem bacteriana.

3.3.6.3.2 Sistema de CRISPR/Cas9 com dois vetores

A construção do cassete de DNA doador ocorreu de maneira efetiva, o produto de 914 pb foi obtido por PCR juntando os fragmentos *upstream* e *downstream* do gene Bsem_02858 (Figura 3.19) utilizando os primers Homo_MTase01F e Homo_MTase04R.

Figura 3.19 - Produtos de PCR para a construção do cassete de DNA doador. **A.** 1° *round* de PCR, obtenção dos fragmentos *upstream* (Homo_UP) e *downstream* (Homo_DN) do gene Bsem_02858. M - marcador molecular 1Kb plus, B1 - controle negativo para primers Homo_MTase01F e Homo_MTase02R, 1-3 - fragmento *upstream* (Homo_UP) de 473 pb, B2 - controle negativo para primers Homo_MTase03F e Homo_MTase04R, 4-6 - fragmento *downstream* (Homo_DN) de 441 pb. **B.** 2° *round* de PCR constituído pela junção dos dois fragmentos obtidos no 1° *round* de PCR, M - marcador molecular 1 Kb plus, 1- DNA genômico de TC3.4.2R3, 2-5 - produto de PCR da junção dos fragmentos Homo_UP e Homo_DN, originando o DNA doador, Homo_Bsem_02858 de 914 pb





A eficiência de transformação de *E. coli* DH5a com pTarget_MTF foi de 9,47x10⁴ UFCs/µg de DNA plasmidial, utilizando a razão 7:1 (inserto:vetor). O produto das PCRs de colônia de 18 UFCs possivelmente transformadas com o pTarget_MTF originou o tamanho esperado de 284 pb. Sendo então, confirmada a obtenção do plasmídeo pTarget_MTF, que foi extraído de 5 das células transformantes e estocado a -20°C para posterior utilização. A confirmação do plasmídeo pTarget_MTF foi realizada por PCR, utilizando o primer pT_2858_Fw que anela especificamente na seguência do sgRNA_MTAse (Figura 3.20B).

Figura 3.20 - Construção do vetor pTarget_MTF. **A.** Gel de agarose, M- marcador molecular 1 Kb plus, 1-2 - extração de pTargetF, 3-4 - dupla digestão com *Bam*HI/*Eco*RI de pTargetF (2.117 pb). **B.** Representação esquemática do vetor pTarget_MTF, com destaque (azul) para a localização dos primers pT_2858_Fw (anela na sequênci N₂₀ específica do gene Bsem_02858) e pTarget_Fv (JIANG *et al.*, 2015 - desenhado para detecção do vetor). **C.** Produtos de PCR de colônia de transformação da ligação vetor inserto em *E. coli* competente. M - marcador molecular 1Kb plus, 1-18 - colônias recuperadas da transformação, 19 - PCR de plasmídeo extraído da célula utilizada em PCR de colônia da coluna 1



FONTE: Tsui (2021)

A obtenção de TC3.4.2R3::pCas ocorreu por mobilização do plasmídeo pCas transformado em GT115 em TC3.4.2R3 com auxílio da linhagem auxiliar (*helper*) pRK2013. Os exconjugantes obtidos foram avaliados por PCR de colônia quanto à presença do plasmídeo pCas, bem como a identidade de TC3.4.2R3 utilizando primers específicos. Por PCR de colônia foi observado que 9 dos 20 exconjugantes avaliados, apresentam a banda correspondente ao plasmídeo pCas de 888 pb (Figura 3.21A). Todos os exconjugantes (apresentando ou não a banda referente ao pCas) apresentaram produto de PCR para amplificação da região do gene Bsem_02858 (primers RT-PCR_2858_Fw e RT-PCR_2858_Rv) (Figura 3.21B), confirmando assim que os exconjugantes numerados como 5, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19 e 20 (Figura 3.21A) são TC3.4.2R2::pCas (apresentam banda espefícica de pCas e da linhagem TC3.4.2R3). Todos esses 9 exconjugantes TC3.4.2R2::pCas foram estocados em glicerol 20% a -80°C para posterior utilização.

Figura 3.21 - Produtos de PCR de colônia realizada com os exconjugantes obtidos da conjugação triparental com GT115::pCas, TC3.4.2R3 e pRK2013. **A.** PCR com primers específicos para detecção de pCas (pCas9KmF e pCas9KmR), gerando produto de 888 pb, M- marcador molecular, 1-20 - produto de PCR dos exconjugantes TC3.4.2R3::pCas, B - control negativo da reação com água Milli-Q, 22- produto utilizando gDNA de TC3.4.2R3 selvagem, 23-24 - produto utilizando plasmídeo pCas. **B.** PCR com primers confirmação de identidade de exconjugantes

como TC3.4.2R3, utilizando primers RT-PCR_2858_Fw e RT-PCR_2858_Rv, gerando produto de 644 pb, M- marcador molcular, 1-20 - produto de PCR de exconjugantes TC3.4.2R3::pCas, 21-22 - produto utilizando gDNA de TC3.4.2R3 selvagem, 23 - produto utilizando plasmídeo pCas



A eficiência da transformação de TC3.4.2R3::pCas eletrocompetentes com pTarget_MTF e Homo_Bsem02858 foi de 1,73x10⁴ UF/µg DNA plasmidial. Foram avaliadas 31 células transformantes por PCR de colônia utilizando os primers que anelam na região do DNA doador. As colônias que apresentaram produto de PCR (6, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30 e 31), possuem o referido fragmento no mesmo tamanho que o DNA genômico selvagem de TC3.4.2R3 (1.585 pb), indicando que não houve a mutagênese por CRISPR/Cas em nenhuma das colônias avaliadas (Figura 3.22). Não foi possível obter mutantes de TC3.4.2R3 pelo sistema de dois plasmídeos CRISPR/Cas.

Figura 3.22 - Produto de PCR de colônia para verificação de potenciais canditados mutantes deletérios do gene Bsem_02858 via CRISPR/Cas com sistema de dois vetores. Os primers utilizados foram Homo_MTase01F e Homo_MTase04R que originariam um produto de 1.585 pb. A linhagem mutante apresentaria 914 pb (tamanho correspondente ao cassete de DNA doador). M- marcador molecular 1Kb plus, 1-31 - possíveis mutantes deletérios de Bsem_02858, B- controle negativo utilizando água Milli-Q, 33- gDNA de TC3.4.2R3, 34-produto da junção Homo_Bsem_02858



FONTE: Tsui (2021)

3.3.6.4 Sistema de deleção I-Scel

A construção dos plasmídeos pDel2858 e pDel5760 (Tabela 3.1) foi possível via obtenção de fragmentos de DNA via PCR, seguido de clonagem no plasmídeo pGPI-Scel por meio do sistema Gibson.

A obtenção de exconjugantes de TC3.4.2R3 contendo o plasmídeo pDel2858 e/ou pDel5760 também não apresentou problemas. No entanto, na etapa de introdução do plasmídeo pDAI-SceI-SacB (utilizado para induzir o 2° evento de recombinação homóloga), houve uma inversão na resistência aos antibióticos dos co-integrantes de TC3.4.2R3. Quando foram re-inoculados em meio LBA contendo os antibióticos trimetoprima (100 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL) assim como em LBA contendo tetraciclina (150 µg/mL) e gentamicina (50 µg/mL), as poucas colônias obtidas não cresceram em placas de LBA contendo o antibiótico tetraciclina, mas cresceram muito bem em placas de LBA contendo trimetoprima.

No processo de resolução de co-integrantes, espera-se o contrário, crescimento em placas contendo tetraciclina e sensibilidade a placas contendo trimetroprima, pois no 2° evento de recombinação homóloga (quando sucedido), o gene de resistência a trimetroprima é removido. Sendo a resistência a tetraciclina justificada pela presença do plasmídeo pDAI-SceI-SacB.

A fim de se verificar se os plasmídeos utilizados na metodologia estavam funcionando normalmente, foi realizado um teste (controle positivo) com a *B. cenocepacia* K56-2 (Tabela 3.1) e com um plasmídeo de deleção pQIB9 (Tabela 3.1), preparado para esta linhagem (gentilmente cedidos pela aluna do Prof. Miguel Valvano, a MSc. Amy Jane Sterling). Foi verificado que o plasmídeo pDAI-Scel-SacB estava expressando adequadamente a enzima I-Scel, visto que, após a segunda conjugação, os exconjugantes de K56-2 foram sensíveis ao antibiótico trimetoprima (100 μg/mL), e resistentes à tetraciclina (150 μg/mL).

Considerando também a concentração de antibióticos utilizada para *B. cenocepacia* K56-2 por Flannagan *et al.* (2008) e no presente estudo para a linhagem TC3.4.2R3, foi realizado um teste simples de crescimento em placas contendo meio de cultura suplementado com antibióticos. Houve uma diferença na coloração de TC3.4.2R3 crescida em LBA sem adição de antibióticos (Figura 3.23A) e em LBA suplementado com gentamicina a 50 µg/mL (Figura 3.23).

A linhagem TC3.4.2R3 crescida LBA suplementado com ampicilina a 200 µg/mL (Figura 3.23C), apresentou uma coloração mais similar com aquelas crescidas em LBA sem adição de antibiótico (Figura 3.23A). Finalmente, TC3.4.2R3 crescida em placas de LBA contendo gentamicina e ampicilina (Figura 3.23D), apresentou coloração muito similar àquela observada em placas suplementadas somente com gentamicina a 50 µg/mL (Figura 3.23B).

Figura 3.23 - Crescimento de TC3.4.2R3 na presença dos antibióticos, gentamicina e ampicilina. Diluições seriadas de uma cultura de TC3.4.2R3 foram feitas e 5 µL da cultura sem diluição (*Neat*) e 5 µL das diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁹ foram semeadas em placas contendo meio LBA. **A.** Meio de cultivo LBA sem qualquer adição de antibiótico; **B.** Meio de cultivo LBA suplementadas com gentamicina a 50 µg/mL; **C.** Meio de cultivo LBA suplementadas com ampicilina a 200 µg/mL e **D.** Meio de cultivo LBA suplementadas com ampicilina a 200 µg/mL e gentamicina a 50 µg/mL, todas as placas foram incubadas a 30°C por 24 horas







Acredita-se que possa existir alguma alteração na fisiologia de TC3.4.2R3 na presença de gentamicina e, portanto, a alteração na coloração de suas colônias. Visando minimizar este efeito de causa desconhecida, a concentração de gentamicina foi reduzida para 15 µg/mL. Dessa forma, linhagens que deveriam ter o crescimento evitado no procedimento de mutagênese, como *E. coli* (portadores dos plasmídeos pDel2858 ou pDel5760) e a linhagem *helper* pRK2013 foram cultivadas em placas de LBA suplementadas com gentamicina a 15 µg/mL para garantir que essas linhagens fossem sensíveis a esse antibiótico nessa concentração (dados não mostrados). A concentração final de tetraciclina foi também reduzida de 150 µg/mL para 100 µg/mL.

O meio de cultivo utilizado para todas as etapas do processo de mutagênese foi LB e LBA suplementado com os antibióticos apropriados. Foi realizado um teste com o meio SOB sólido para a segunda conjugação (conjugação com o plasmídeo pDAI-SceI-SacB) e foi observado que o número de colônias obtidas após a mudança de LBA para um meio rico foi aumentado exponencialmente. Assim, passou-se a utilizar meio SOB para o crescimento de exconjugantes (colônias obtidas após a segunda conjugação) e foram feitas diluições em série até 10⁻¹² para a obtenção de colônias isoladas (Figura 3.24).

Figura 3.24 - Resolução do co-integrante de TC3.4.2R3 com o plasmídeo de deleção pDel5760 (deleção do cluster n-TASE) por meio da clonagem com o plasmídeo pDAI-SceI-SacB. **A.** Utilização do meio SOB sólido (tetraciclina a 100 µg/mL e gentamicina a 15 µg/mL), obtenção de maior número de colônias isoladas a partir da diluição 10⁻¹²; **B.** Utilização do meio LBA (tetraciclina a 100 µg/mL e gentamicina a 50 µg/mL), poucas colônias (não forama feitas diluições da suspensão da conjugação)


FONTE: Tsui (2021)

Mesmo com a obtenção de maior número de exconjugantes, eles continuaram resistentes tanto ao antibiótico tetraciclina como à trimetoprima. No último ensaio deste experimento, 300 colônias de cada mutagênese (Bsem_02858 e cluster) foram semeadas em duas placas de meio SOB sólido, uma contendo tetraciclina (100 µg/mL) e gentamicina (15 µg/mL) e a outra contendo trimetoprima e tetraciclina (100 µg/mL cada). Nenhuma das colônias testadas mostrou-se sensível a trimetoprima.

Foi realizado um último ensaio para confirmar que nenhum mutante foi positivo para a mutagênese foi obtido pelo sistema de deleção I-Scel. Fez-se uma PCR com três colônias de exconjugantes de uma das tentativas de resolução de Δ2858 (TC3.4.2R3::pDel2858), bem como para Δ5760 (TC3.4.2R3::pDel5760). Assim as reações de PCR foram realizadas utilizando um par de primers que anelam na região flanqueadora a montante e a jusante de Bsem_02858, que foram Detec_bs2857_Fw combinado com Detec_bs2859_Rv (Tabela 3.8). O produto esperado para esta combinação seria de 2.103 pb no genoma de TC3.4.2R3 selvagem.

Se a deleção para o gene Bsem_02858 tivesse ocorrido conforme esperado, um fragmento de 545 pb de Bsem_02858 seria perdido, e o produto de PCR esperado para o mutante deletério de Bsem_02858 apresentaria aproximadamente 1,4 Kb e no caso dos exconjugantes do cluster de quatro genes, não apareceriam produtos, porque essa região seria removida (Figura 3.25). **Figura 3.25** - Resolução dos co-integrantes $\Delta 2858$ (TC3.4.2R3 com integração de pDel2858) e $\Delta 5760$ (TC3.4.2R3 com integração pDel5760) via PCR. **A.** Representação esquemática dos genes (cinza - Bsem_02857; amarelo - Bsem_02858; verde - Bsem_02859 e Bsem_02860) que compõem o n-TASE na linhagem TC3.4.2R3, mutantes $\Delta 2858$ e $\Delta 5760$. Localização do par de primers, Detec_bs2857_Fw e Detec_bs2859_Rv (traços de cor azul); **B.** Eletroforese para verificação de deleção por PCR



FONTE: Tsui (2021)

Para os exconjugantes de $\Delta 2858$ (Figura 3.25B - colunas 1-3), havia três bandas de produto de PCR para as colônias 1 e 2, uma banda forte na altura de 10 Kb, outra mostrando aproximadamente 2 Kb e um pequeno fragmento de aproximadamente 1,5 Kb. A colônia 3 não apresentou três bandas, apenas a mais forte de 10 Kb. Para os exconjugantes de $\Delta 5760$ (Figura 3.25B - colunas 4-6), nos quais não deveriam existir quaisquer produtos, havia uma banda forte com 2 Kb. O produto observado é exatamente do mesmo tamanho daquele observado para o genoma de TC3.4.2R3 selvagem. Considerando que todo o cluster tem aproximadamente 4,4 Kb e o plasmídeo suicida, pGPI-Scel tem 4,7 Kb (adicionados a 1 Kb do fragmento de deleção que corresponde a montante e a jusante de Bsem_02858), a banda maior de 10 Kb (Figura 3.25B) pode ser devido ao genoma do merodiplóide TC3.4.2R3 obtido após integração com pDel2858 (aqui denominado de colônia co-integrante).

Na deleção do gene Bsem_02858, a primeira conjugação funcionou muito bem, no entanto, a segunda conjugação não ocorreu. Com essa análise de PCR foi possível confirmar que, para a deleção de quatro genes, ela não funcionou desde a primeira conjugação, pois o produto de PCR obtido com seus exconjugantes foi o mesmo observado para a linhagem selvagem (Figura 3.25B).

Se este padrão de três bandas nos exconjugantes de Bsem_02858 foi observado para a deleção de um único gene utilizando primers que anelam em regiões que flanqueiam o gene alvo, era esperado que se fossem utilizados primers que anelassem na região flanqueadora de toda a sequência do cluster para verificação dos exconjugantes de Δ 5760 também dessem origem a três bandas. A fim de se verificar esta possibilidade o par de primer Bsem2856_clusterFw e Bsem2861_clusterRv (Tabela 3.6) foi utilizado para uma PCR com os mesmos três exconjugantes de Δ 5760 (Figura 3.25B - colunas 4-6). O amplicon esperado para esta PCR no genoma de TC3.4.2R3 selvagem era de 5.486 pb e se a deleção do cluster de quatro genes fosse bem-sucedida, o amplicon esperado seria de 1.158 pb (Figura 3.26).

Não foram observadas as três bandas, apenas uma banda para os três exconjugantes analisados, e eles têm o mesmo tamanho observado para a linhagem selvagem. Esse resultado pode significar que mesmo o pGPI-Scel carregando a construção de deleção de quatro genes, pDel5760, não foi clonado em TC3.4.2R3, não há um genótipo merodiplóide observado para essa mutagênese.

Figura 3.26 - Três Δ5760 exconjugantes (TC3.4.2R3 com integração pDel5760) foram avaliados com PCR. **A.** Representação esquemática dos genes (cinza - Bsem_02857; amarelo - Bsem_02858; verde - Bsem_02859 e Bsem_02860) que compõem o n-TASE na linhagem TC3.4.2R3 e Δ5760. Localização do par de primers, Bsem2856_clusterFw e Bsem2861_clusterRv (traços de cor azul); **B.** Eletroforese para verificação de deleção por PCR



FONTE: Tsui (2021)

O número de exconjugantes que foi analisado por PCR foi muito pequeno considerando o número de colônias obtidas após a resolução do co-integrante, havendo duas razões para isso, o cultivo em placas contendo meio de cultura suplementadas com o antibiótico trimetroprima mostrou que nenhuma das colônias exconjugantes obtidas foi resolvida e a DNA polimerase usada para esta análise foi OneTaq[®] DNA Polymerase (New England Biolabs). O que se tornaria uma metodologia muito onerosa para a triagem de colônias. Além do mais, as reações de PCR para a verificação dos exconjugantes foram prosseguidas com volume final de reação de 10 μL, seria um esforço inútil para rastrear colônias que já não esperamos como mutantes positivos. Assim, as PCRs foram realizadas apenas para ver o que estava acontecendo com os co-integrantes após a etapa de resolução.

A recombinação após a conjugação com o plasmídeo suicida pGPI-Scel ocorreu para a deleção do gene Bsem_02858. No entanto a segunda recombinação que favoreceria uma substituição alélica, não ocorreu em *B. seminalis* TC3.4.2R3. É possível que não haja nenhum sistema de reparo de quebra de fita dupla em *B. seminalis*. A metodologia de deleção utilizada por Flannagan *et al.* (2008), não foi eficaz para a geração de mutantes em *B. seminalis,* mesmo tendo sido amplamente utilizada para estudos genéticos de *B. cenocepacia*. Por todas as razões mencionadas neste item, a busca por uma metodologia alternativa de mutagênese foi necessária para prosseguir com este estudo para o entendimento do cluster em TC3.4.2R3.

3.3.6.4.1 Essencialidade de Bsem_02858

Três mutantes condicionais (Cond-2858_1, Cond-2858_2 e Cond-2858_3) confirmados por PCR e sequenciamento (dados não apresentados) apresentaram crescimento igual à linhagem selvagem TC3.4.2R3. O gene Bsem_02858 não é essencial para *B. seminalis*, visto que o mutante condicional para *Bsem_02858*, Cond-2858 foi capaz de crescer igualmente bem em placas suplementadas com ramnose e em glicose. Nenhum fenótipo letal foi observado, confirmando que o Bsem_02858 não é um gene essencial para a viabilidade do TC3.4.2R3 (Figura 3.27).

Figura 3.27 - Crescimento dos mutantes condicionais Cond-2858_1, Cond-2858_2 e Cond-2858_3 em placas contendo meio LBA suplementadas com 0,5% (m/v) de ramnose (lado esquerdo) e 0,5% (m/v) de glicose (lado direito)



FONTE: Tsui (2021)

3.3.6.4.2 Compatibilidade de vetores em TC3.4.2R3

Todas as colônias sobreviveram após a conjugação com os plasmídeos testados (Tabela 3.7). Não foi observada incompatibilidade dos vetores pDA12, pDAI-Scel, pDAI-Scel-SacB, pSCRhaB2 e pBBRMCS-3 para TC3.4.2R3. Todas as conjugações ocorreram com o número padrão de colônias. Indicando que a impossibilidade de obtenção de mutantes não se deve à escolha do plasmídeo pDAI-Scel-SacB *per si*.

3.3.6.5 Mutagênese por inserção de pGPΩTp

Os plasmídeos de inserção pSST57 e pSST58 contendo fragmento dos genes Bsem_02857 e Bsem_02858, respectivamente, foram sequenciados e apresentaram o fragmento de inserção correto para cada gene alvo. Além disso, mutantes candidatos foram confirmados por PCR utilizando os primers #1300 e Detec_bs2858_Fw e #3627 e Detec_bs2858_Rv que originam produtos de PCR de ~500 pb (Figura 3.28). Foram obtidos mutantes para o gene Bsem_02857 (glicosiltransferase) e Bsem_02858 (metiltransferase) por meio da mutação insercional via pGPΩTp.

No mutante SST57, a inserção do plasmídeo pSST57 ocorreu a 364 pb do sítio de iniciação de transcrição do gene Bsem_02857 (códon ATG), enquanto que no mutante SST58, a inserção do plasmídeo pSST58 ocorre a 146 pb do sítio de iniciação de transcrição do gene Bsem_02858 (códon ATG). Nesta metodologia, não ocorre remoção de nenhum fragmento da sequência gênica, apenas a

integração do respectivo plasmídeo construído (pSST57 ou pSST58). Assim, a transcrição do gene interrompido, ocorre até o local dos fragmentos ômega (Figura 3.28A), responsáveis pela interrupção da transcrição e tradução do fragmento gênico à jusante.

Figura 3.28 - Obtenção do mutante SST58 via inserção do plasmídeo pGPΩTp. **A.** Representação esquemática da metodologia. Localização dos primers #1300 (vermelho) e Detec_bs2858_Fw (preto) e #3627 (vermelho) e Detec_bs2858_Rv (preto). **B.** Eletroforese de PCR utilizando os primers #1300 e Detec_bs2858_Fw, 1- SST58; 2- TC3.4.2R3; 3- pGPΩTp; 4- Controle de PCR com água Milli-Q. **C.** Eletroforese de PCR utilizando os primers #3627 e Detec_bs2858_Rv, 1- SST58; 2- TC3.4.2R3; 3- pGPΩTp; 4- Controle de PCR com água Milli-Q



FONTE: Tsui (2021)

Considerando as dificuldades na otimização de uma metodologia para construção de mutantes em *B. seminalis* TC3.4.2R3, os mutantes insercionais polares foram considerados estáveis e confiáveis para a análise fenotípica. Assim, a função do cluster n-TASE foi estudada com base nos dois mutantes insercionais obtidos, visto que o mutante SST57 possui todos os genes do *cluster* interrompidos (seu fenótipo será relacionado à função do cluster inteiro), enquanto o mutante SST58 apresenta expressão do gene Bsem_02857, mas interrupção de Bsem_02858, Bsem_02859 e Bsem_02860 (seu fenótipo à falta de expressão do genes interrompidos).

Mutantes para os demais genes (Bsem_02821; Bsem_02838; Bsem_02840; Bsem_02841; Bsem_02843, Bsem_02845; Bsem_02859 e Bsem_02860) não foram obtidos até o presente momento. Para os genes Bsem_02859 e Bsem_02860 descobriu-se muito posteriormente que havia um nucleotídeo faltando na sequência de reconhecimento da enzima *Xba*I, para os demais genes, o planejamento da mutagênese foi realizado posteriormente, assim, não houve tempo hábil para a obtenção desses mutantes. O experimento precisou ser parado na etapa pré-ligação de inserto e vetor pGPΩTp para a construção desses mutantes.

3.3.6.5.1 Teste de estabilidade

Os mutantes SST57 e SST58 mostraram-se estáveis após 280 gerações, visto que não perderam a resistência ao antibiótico trimetoprima e o plasmídeo pGPΩTp.

3.3.7 Complementação gênica dos mutantes SST57 e SST58

A complementação dos mutantes SST57 e SST58 com o gene Bsem_02858 não foi possível, pois colônias positivas utilizando os plasmídeos de complementação, pDA17 ou pDA181 não foram obtidas.

3.3.8 RT-PCR para confirmação de mutantes SST57 e SST58

3.3.8.1 Validação de primers para RT-PCR

Previamente à realização de RT-PCR foi realizada a otimização da temperatura de anelamento dos pares de primers. Assim, a enzima utilizada foi a GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e as temperaturas de anelamento para cada um dos primers foi determinada de acordo com o resultado na análise das sequências com auxílio da ferramenta Tm Calculator (New England Biolabs).

Tabela 3.13 - Confirmação de amplificação utilizando temperaturas de anelamento para cada um dos primers específicos em gradiente de temperatura de 53°C a 63°C utilizando GoTaq® DNA Polymerase. A presença de um ponto preto preenchido na temperatura indicada representa a presença de produto de PCR a partir de DNA genômico de TC3.4.2R3 para a combinação de primers

	Par de primer	Gradiente de temperatura testado para anelamento dos primers						Amplicon (pb)
		53°C	55°C	57°C	59°C	61°C	63°C	
1	RT-PCR_2857_Fw	•						996
	RT-PCR_2857_Rv							
2	RT-PCR_2858_Fw						•	664
	RT-PCR_2858_Rv							
3	RT-PCR_2859_Fw				•			878
	RT-PCR_2859_Rv							
4	RT-PCR_2860_Fw		•					1.857
	RT-PCR_2860_Rv							
5	RT-2858-Fw			•				124
	Detec_bs2858_Rv							
6	RT-2857-Fw		•					116
	Detec_bs2857_Rv							

Assim, todos os primers desenhados para RT-PCR permitiram a obtenção de produtos de PCR a partir do DNA genômico de TC3.4.2R3 nas temperaturas de anelamento obtidas pela ferramenta acima mencionada, como apresentado na figura 3.29. Portanto, as etapas seguintes para realização de RT-PCR foram possíveis após a validação dos primers e otimização das temperaturas de anelamento (Tabela 3.13). O produto obtido com os primers RT-PCR_2857_Fw e RT-PCR_2857_Rv para detecção do gene Bsem_02857 está bem menos intenso comparado às outras bandas.

Figura 3.29 - Validação de primers em gradiente de temperatura de 53°C a 63°C. M- marcador molecular 1Kb plus; 1- RT-PCR_2857_Fw e RT-PCR_2857_Rv com gene alvo Bsem_02857; 2- RT-PCR_2858_Fw e RT-PCR_2858_Rv com gene alvo Bsem_02858; 3- RT-PCR_2859_Fw e RT-PCR_2859_Rv gene alvo Bsem_02859; 4- RT-PCR_2860_Fw e RT-PCR_2860_Rv gene alvo Bsem_02860; 5- RT-2858-Fw e Detec_bs2858_Rv com gene alvo Bsem_02858 e 6- RT-2857-Fw e Detec_bs2857_Rv com gene alvo Bsem_02857. B- controle negativo utilizando água Milli-Q e o par de primers RT-PCR_2857_Fw e RT-PCR_2857_Rv



FONTE: Tsui (2021)

3.3.8.2 Extração de RNA

A extração do RNA das linhagens TC3.4.2R3, SST57 e SST58 por meio do kit TRIzoITM Plus RNA Purification Kit (Ambion) foi confirmada por eletroforese (Figura 3.30) e quantificado em aparelho NanoDrop, resultando nas concentrações de 74,4 ng/µL, 77,8 ng/µL e 83,7 ng/µL, respectivamente. A razão 260/280 ficou entre 1,82 a 1,94. A razão 260/280 de 2,0 é geralmente utilizada como referência de indicativo de pureza do RNA. A qualidade do RNA total extraído para a síntese de cDNA foi adequada, uma vez que as principais bandas (23S e 16S) estão bem nítidas no gel de agarose, além disso, não foram observados sinais de degradação do RNA e nem de contaminação com DNA.





FONTE: Tsui (2021)

3.3.8.3 Reação de RT-PCR

A PCR realizada com o DNA genômico das linhagens TC3.4.2R3, SST57 e SST58 resultou em produto de PCR para todos os alvos em TC3.4.2R3 (linhagem selvagem). Com o gDNA de SST57 e SST58, houve amplificação apenas de produto utilizando os primers que anelam no gene Bsem_02859 (Tabela 3.14 e Figura 3.31).

Tabela 3.14 - Amplificação utilizando gDNA (DNA genômico) e cDNA de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 com os diferentes pares de primers (indicados de 1 a 6) desenhados especificamente para a região intragênica dos genes Bsem_02857, Bsem_02858, Bsem_02859 e Bsem_02860 que formam o cluster de quatro genes em *B. seminalis* TC3.4.2R3

	Par de primer	DNA	genômic	Ö	cDNA			
		TC3.4.2R3	SST57	SST58	TC3.4.2R3	SST57	SST58	
1	RT-PCR_2857_Fw	•	0	0	•	0	•	
	RT-PCR_2857_Rv							
2	RT-PCR_2858_Fw	•	0	0	•	0	0	
	RT-PCR_2858_Rv							
3	RT-PCR_2859_Fw	•	•	•	•	0	0	
	RT-PCR_2859_Rv							
4	RT-PCR_2860_Fw	•	0	0	•	0	0	
	RT-PCR_2860_Rv							
	5							

• Presença de produto de PCR

• Ausência de produto de PCR

Figura 3.31 - Amplificação utilizando gDNA (DNA genômico) de **A.** TC3.4.2R3, **B.** SST57 e **C.** SST58 utilizando os diferentes pares de primers (números correspondentes à numeração da tabela 3.14). 1- primers RT-PCR_2857_Fw e RT-PCR_2857_Rv; 2- primers RT-PCR_2858_Fw e RT-PCR_2858_Rv; 3- primers RT-PCR_2859_Fw e RT-PCR_2859_Rv e 4 - RT-PCR_2860_Fw e RT-PCR_2860_Fw e RT-PCR_2860_Rv



FONTE: Tsui (2021)

A RT-PCR realizada com cDNA de TC3.4.2R3 resultou em amplicons que apresentaram tamanhos esperados (Figura 3.32). Nenhuma amplificação inesperada foi observada para o cDNA de mutantes utilizando os pares de primers numerados de 1-4 (Tabela 3.14).

Figura 3.32 - Confirmação de mutantes por RT-PCR utilizando cDNA de 1-TC3.4.2R3, 2- SST57, 3- SST58 e 4- controle negativo utilizando água Milli-Q. Apresentação da eletroforese (imagens à esquerda) acompanhados de representação gênica das linhagens TC3.4.2R3, SST57 e SST58, o "X" vermelho sobre a seta (representação do gene), indica interrupção do respectivo gene por inserção do pGPΩTp (mutação polar). Setas pretas conectadas por linha cinza tracejada mostram localização dos primers e tamanho do respectivo amplicon. **A.** Produto de RT-PCR obtido com a utilização dos primers que anelam no Bsem_02857 (RT-PCR_2857_Fw e RT-PCR_2857_Rv), originando um amplicon de 996 pb. **B.** Produto de RT-PCR obtido com a utilização dos primers que anelam no Bsem_02858 (RT-PCR_2858_Fw e RT-PCR_2858_Rv), originando um amplicon de 664 pb. **C.** Produto de RT-PCR obtido com a utilização dos primers que anelam no Bsem_02859 (RT-PCR_2859_Fw e RT-PCR_2859_Fw, originando um amplicon de RT-PCR obtido com a utilização dos primers que anelam no Bsem_02859 (RT-PCR_2859_Fw e RT-PCR_2859_Fw e RT-PCR_2859_Fw e RT-PCR_2859_Rv), originando um amplicon de RT-PCR obtido com a utilização dos primers que anelam no Bsem_02859 (RT-PCR_2859_Rv), originando um amplicon de RT-PCR obtido com a utilização dos primers que anelam no Bsem_02859 (RT-PCR_2859_Fw e RT-PCR_2859_Rv), originando um amplicon de RT-PCR obtido com a utilização dos primers que anelam no Bsem_02859 (RT-PCR_2860_Fw e RT-PCR_2860_Fw e RT-



FONTE: Tsui (2021)

Os resultados foram satisfatórios para sustentar a confirmação de mutantes de TC3.4.2R3 nos genes Bsem_02857 e Bsem_02858, devido à ausência de produtos originários da cDNA por RT-PCR, de acordo com o esperado para uma expressão de mutantes polares.

3.3.9 Caracterização fenotípica de mutantes SST57 e SST58

3.3.9.1 Atividade antagônica

3.3.9.1.1 Atividade antimicrobiana do mutante de transposon M30

O teste de atividade antimicrobiana de TC3.4.2R3 e do mutante M30 contra aos fungos Rhizoctonia sp.; F. verticillioides; F. oxysporium; Colletotrichum sp.; Colletotrichum falcatum; Sclerotinia sp.; C. paradoxa; Rhyzopus sp. e Aspergillus fumigatus, permitiu observar que os fungos fitopatogênicos C. paradoxa e Rhyzopus sp. não apresentaram alterações em seu crescimento na presença de B. seminalis TC3.4.2R3 ou M30. O perfil de inibição do mutante M30 (inserção de transposon no gene Bsem_02858) não é diferente do observado na linhagem selvagem TC3.4.2R3 (Tabela 3.15).

Espécie de fungo		<i>B. seminalis</i> TC3.4.2R3	Mutante M30
Rhizoctonia sp.	+		+
Fusarium verticillioides	+		+
Fusarium oxysporum	+		+
Colletotrichum falcatum	+		+
Colletotrichum sp.	+		+
Sclerotinia sp.	+		+
Rhyzopus sp.	-		-
Aspergillus fumigatus	+		+
Ceratocystis paradoxa	-		-
(+) inibiu o crescimento			

Tabela 3.15 - Resultado qualitativo de antagonismo de TC3.4.2R3 e mutante M30 contra fungos fitopatogênicos

(-) não inibiu o crescimento

3.3.9.1.2 Atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos

Observa-se que o padrão de atividade antifúngica no ensaio qualitativo, é o mesmo entre TC3.4.2R3 e seus mutantes, assim, na ausência de atividade antagônica na linhagem selvagem TC3.4.2R3, esta também não foi observada nos mutantes, no caso dos fungos WLA-FP03 (T. paradoxa), WLA-FP15 (F. oxysporium), WLA-FP16 (F. verticillioides), WLA-FP22 (F. solani), WLA-FP24 (F. solani), WLA-FP26 (F. oxysporum f.sp. passiflorae) e WLA-FP27 (F. circinatum) (Tabela 3.16).

No caso, das demais linhagens de B. seminalis, LMG19567, LMG24067, LMG24271, LMG24272 e LMG24273, não foi possível concluir os testes de antagonismo contra todos os fungos listados na tabela 3.10 em tempo hábil, assim só foi realizado o ensaio com alguns dos isolados de *Fusarium*, foi observado que LMG24273 apresentou atividade antagônica contra todos eles (Tabela 3.16).

Tabela 3.16 - Resultado qualitativo da avaliação de atividade antimicrobiana de *B. seminalis* TC3.4.2R3, SST57, SST58, LMG19567, LMG24067, LMG24271, LMG24272 e LMG24273 contra os fungos fitopatógenos da coleção do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana do Departamento de Microbiologia, ICB/USP

	Lin	hage	ns de	B. ser	ninalis	*		
atogênicos testados	1	2	3	4	5	6	7	8
Ceratocystis fimbriata	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Colletotrichum sp.	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Thielaviopsis paradoxa	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium sacchari	+	+	+	-	-	-	-	+
Fusarium verticillioides	+	+	+	+	+	+	+	+
Curvularia lunata	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium oxysporum fsp. vasinfectum	+	+	+	+	+	+	+	+
Fusarium equisetum	+	+	+	+	+	+	+	+
Fusarium graminearum	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Bipolaris sorolaniana	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium oxysporum	+	+	+	+	+	+	+	+
Fusarium oxysporum	+	+	+	-	-	-	+	+
Fusarium oxysporum	+	+	+	-	-	-	+	+
Fusarium oxysporum	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium oxysporum	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium verticillioides	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium graminearum	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium decemcellulare	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium equiseti	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium oxysporum f. sp. subglutinans	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium solani	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium solani	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium oxysporum f.sp. passiflorae	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium circinatum	-	-	-	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium solani f. sp. passiflorae	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium verticillioides	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
Fusarium verticillioides	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA
	atogênicos testadosCeratocystis fimbriataColletotrichum sp.Thielaviopsis paradoxaFusarium sacchariFusarium verticillioidesCurvularia lunataFusarium oxysporum fsp. vasinfectumFusarium quisetumFusarium graminearumBipolaris sorolanianaFusarium oxysporumFusarium oxysporum f. sp. lycopersiciFusarium oxysporum f. sp. subglutinansFusarium oxysporum f. sp. subglutinansFusarium oxysporum f. sp. vasinfectumFusarium oxysporum f. sp. passifloraeFusarium oxysporum f. sp. passifloraeFusarium oxysporum f. sp. passifloraeFusarium solaniFusarium solani f. sp. passifloraeFusarium verticillioidesFusarium verticillioidesFusarium verticillioidesFusarium verticillioides	Linkatogênicos testados1Ceratocystis fimbriata+Colletotrichum sp.+Thielaviopsis paradoxa-Fusarium sacchari+Fusarium verticillioides+Curvularia lunata+Fusarium oxysporum fsp. vasinfectum+Fusarium equisetum+Fusarium graminearum+Bipolaris sorolaniana+Fusarium oxysporum+Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici+Fusarium oxysporum f. sp. subglutinans+Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum+Fusarium solani+Fusarium solani+Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli+Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli+Fusarium oxysporum f. sp. passiflorae+Fusarium solani f. sp. passiflorae+Fusarium solani f. sp. passiflorae+Fusarium solani f. sp. passiflorae+Fusarium verticillioides+Fusarium verticillioides+Fusarium verticillioides+Fusarium v	Linkagenatogênicos testados12Ceratocystis fimbriata++Colletotrichum sp.++Thielaviopsis paradoxaFusarium sacchari++Fusarium verticillioides++Curvularia lunata++Fusarium oxysporum fsp. vasinfectum++Fusarium equisetum++Fusarium graminearum++Bipolaris sorolaniana++Fusarium oxysporum++Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici++Fusarium oxysporum f. sp. subglutinans++Fusarium solani++Fusarium solani++Fusarium solani++Fusarium oxysporum f. sp. phaseoli++Fusarium solani++Fusarium solani++Fusarium solani++Fusarium solani++Fusarium solani f. sp. passiflorae++Fusarium verticillioides++Fusarium	LinhægensLinhægensdetatogênicos testados123Ceratocystis fimbriata+++Colletotrichum sp.+++Thielaviopsis paradoxaFusarium sacchari+++Fusarium verticillioides+++Curvularia lunata+++Fusarium oxysporum fsp. vasinfectum+++Fusarium equisetum+++Fusarium oxysporum fsp. vasinfectum+++Fusarium oxysporum+++Fusarium oxysporum+++Fusarium oxysporum+++Fusarium oxysporum+++Fusarium oxysporum+++Fusarium oxysporum+++Fusarium oxysporum+++Fusarium oxysporum+++Fusarium oxysporum+++Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici+++Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum+++Fusarium solani++++Fusarium solani++++Fusarium solani++++Fusarium solani++++Fusarium solani++++Fusarium solani++++Fusarium solani++++ <td>Interpretation Interpretation Interpr</td> <td>Linhagens de B. seminalis atogênicos testados 1 2 3 4 5 Ceratocystis fimbriata + + + NA NA Colletotrichum sp. + + + NA NA Thielaviopsis paradoxa - - NA NA Fusarium sacchari + + + + + + Fusarium verticillioides + + + + + + Curvularia lunata + + + + + + + Fusarium oxysporum fsp. vasinfectum + + + + + + Fusarium oxysporum fsp. vasinfectum + + + + NA NA Bipolaris sorolaniana + + + + NA NA Fusarium oxysporum + + + NA NA Fusarium oxysporum + + NA NA Fu</td> <td>Linhagenus Linhagenus B. seminalis* atogènicos testados 1 2 3 4 5 6 Ceratocystis fimbriata + + + NA NA NA Colletotrichum sp. + + + NA NA NA Thielaviopsis paradoxa - - NA NA NA NA Fusarium verticillioides +<</td> <td>Linkagement Linkagement B. seminalis* atogénicos testados 1 2 3 4 5 6 7 Ceratocystis fimbriata + + + NA NA NA NA Colletotrichum sp. + + + NA NA NA NA Fusarium sacchari +</td>	Interpretation Interpr	Linhagens de B. seminalis atogênicos testados 1 2 3 4 5 Ceratocystis fimbriata + + + NA NA Colletotrichum sp. + + + NA NA Thielaviopsis paradoxa - - NA NA Fusarium sacchari + + + + + + Fusarium verticillioides + + + + + + Curvularia lunata + + + + + + + Fusarium oxysporum fsp. vasinfectum + + + + + + Fusarium oxysporum fsp. vasinfectum + + + + NA NA Bipolaris sorolaniana + + + + NA NA Fusarium oxysporum + + + NA NA Fusarium oxysporum + + NA NA Fu	Linhagenus Linhagenus B. seminalis* atogènicos testados 1 2 3 4 5 6 Ceratocystis fimbriata + + + NA NA NA Colletotrichum sp. + + + NA NA NA Thielaviopsis paradoxa - - NA NA NA NA Fusarium verticillioides +<	Linkagement Linkagement B. seminalis* atogénicos testados 1 2 3 4 5 6 7 Ceratocystis fimbriata + + + NA NA NA NA Colletotrichum sp. + + + NA NA NA NA Fusarium sacchari +

(+) inibiu o crescimento

(-) não inibiu o crescimento

NA, não foi realizado o ensaio de antagonismo com o fungo

* 1, TC3.4.2R3; 2, SST57; 3, SST58; 4, LMG19587; 5, LMG24067; 6, LMG24271;

7, LMG24272; 8, LMG24273

Com base nos resultados observados, é possível concluir apenas que o padrão de inibição (ou ausência de inibição) se mantém uniforme para TC3.4.2R3 e seus mutantes (Figura 3.33).

Figura 3.33 - Resultado qualitativo da avaliação de atividade antimicrobiana de *B. seminalis* TC3.4.2R3, SST57 e SST58 contra os fungos WLA-FP10, WLA-FP11 e WLA-FP13, foi constatada presença de atividade antagônica. Em WLA-FP27, não houve atividade antagônica. Observa-se que o padrão de inibição não se modifica entre TC3.4.2R3 e seus mutantes



FONTE: Tsui (2021)

3.3.9.1.3 Atividade antagônica contra *Fusarium* spp. em duas temperaturas

Os resultados dessa análise estão detalhados na tabela 3.17 e na figura 3.34 estão apresentados apenas os resultados com diferença significativa (entre linhagens e de temperaturas).

Tabela 3.17 - Resultado da análise estatística de teste de antagonismo com 25 linhagens de *Fusarium* spp. com TC3.4.2R3, SST57 e SST57 em duas temperaturas, 28°C e 37°C

	Diferença na atividade de antagonismo							
<i>Fusarium</i> spp. testados	TC3.4.2R3 e mutantes a 28°C	TC3.4.2R3 e mutantes a 37°C	28°C e 37°C na linhagem testada					
WLA-FP04	•	0	•					
WLA-FP05	0	0	•					
WLA-FP07	0	•	•					
WLA-FP08	0	0	0					
WLA-FP09	0	•	•					
WLA-FP11	0	0	0					
WLA-FP12	0	0	•					
WLA-FP13	•	0	0					
WLA-FP14	0	0	0					
WLA-FP15	0	0	•					
WLA-FP16	•	•	•					
WLA-FP17	0	0	•					
WLA-FP18	0	0	0					
WLA-FP19	•	0	•					
WLA-FP20	0	0	0					
WLA-FP21	0	0	•					

WLA-FP22	•	•	•
WLA-FP23	0	0	0
WLA-FP24	•	•	•
WLA-FP25	•	•	•
WLA-FP26	0	0	•
WLA-FP27	0	0	0
WLA-FP28	0	0	0
WLA-FP29	0	0	0
WLA-FP30	0	0	•

Apresentou diferença significativa (P<0,05)

• Não apresentou diferença significativa

Figura 3.34 - Atividade de antagonismo de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 contra *Fusarium* spp. em duas temperaturas, 28°C e 37°C. Gráfico à esquerda refere-se à comparação da atividade entre linhagem selvagem e seus mutantes em duas temperaturas e gráfico à direita refere-se à comparação dentre as linhagens em duas temperaturas. No gráfico à esquerda, letras diferentes acima da barra representam que houve diferença significativa entre as médias (apenas dentro da mesma temperatura avaliada). No gráfico à direita, *ns* - não houve diferença significativa e *, ** e *** - houve diferença significativa (P<0,05) de acordo com o teste Tukey. **A.** Atividade de antagonismo avaliada em porcentagem de inibição contra o WLA-FP16, *F. verticillioides.* **B.** Atividade de antagonismo avaliada em porcentagem de inibição contra o WLA-FP22, *F. solani.* **C.** Atividade de antagonismo avaliada em porcentagem de inibição contra o WLA-FP24, *F. solani.* **D.** Atividade de antagonismo avaliada em porcentagem de inibição contra o WLA-FP24, *F. solani.* **C.** Atividade de antagonismo avaliada em porcentagem de inibição contra o WLA-FP24, *F. solani.* **D.** Atividade de antagonismo avaliada em porcentagem de inibição contra o WLA-FP25, *F. oxysporum f. sp. Phaseoli*





Em 64% dos *Fusarium* testados (WLA-FP05, WLA-FP08, WLA-FP11, WLA-FP12, WLA-FP14, WLA-FP15, WLA-FP17, WLA-FP18, WLA-FP20, WLA-FP21, WLA-FP23, WLA-FP26, WLA-FP27, WLA-FP28 e WLA-FP29), não houve diferença na atividade antagônica de TC3.4.2R3 comparado a seus mutantes SST57 ou SST58, tanto a 28°C como 37°C, a porcentagem de inibição não foi significativamente diferente.

Em 60% dos *Fusarium* testados (WLA-FP04, WLA-FP05, WLA-FP07, WLA-FP09, WLA-FP12, WLA-FP15, WLA-FP16, WLA-FP17, WLA-FP19, WLA-FP21, WLA-FP22, WLA-FP24, WLA-FP25, WLA-FP26 e WLA-FP30) foi observada diferença significativa na atividade de antagonismo em pelo menos uma das linhagens bacterianas testadas (TC3.4.2R3, SST57 ou SST58) entre as duas temperatudas avaliadas.

No teste de antagonismo com os fungos, WLA-FP05, WLA-FP12, WLA-FP15, WLA-FP17, WLA-FP21 e WLA-FP26, não houve diferença na atividade antagônica comparando linhagem selvagem com as duas mutantes, porém sob diferentes

temperaturas, foi observada a presença de diferença significativa da atividade antifúngica dentro da linhagem analisada (Figura 3.35).

Figura 3.35 - Efeito da temperatura na atividade de antagonismo de TC3.4.2R3 (WT), SST57 (57) e SST58 (58) contra os fungos, WLA-FP05, WLA-FP12, WLA-FP15, WLA-FP17, WLA-FP21 e WLA-FP26, em duas temperaturas, 28°C (verde) e 37°C (laranja). Mesmo na ausência de diferença significativa entre linhagem selvagem e mutantes. *ns* - não houve diferença significativa e *, ** e **** - houve diferença significativa (P<0,05) de acordo com o teste Tukey. Imagens ao lado direito referentes à diferente atividade de antagonismo contra *Fusarium* sob duas temperaturas. **A.** WLA-FP05, *F. verticillioides;* **B.** WLA-FP12, *F. oxysporum;* **C.** WLA-FP15, *F. oxysporum;* **D.** WLA-FP17, *F. graminearum;* **E.** WLA-FP21, *F. oxysporum* f. sp. *Subglutinans* e **F.** WLA-FP26, *F. oxysporum* f.sp. *passiflorae*





FONTE: Tsui (2021)

Em quatro dos fungos avaliados, WLA-FP16, WLA-FP22, WLA-FP24 e WLA-FP25, houve diferença significativa na atividade de antagonismo entre TC3.4.2R3 e pelo menos um dos mutantes, tanto a 28°C como 37°C bem como diferença significativa na porcentagem de inibição em pelo menos uma das linhagens bacterianas testadas (TC3.4.2R3, SST57 ou SST58) entre as duas temperatudas avaliadas.

3.3.9.1.4 Antagonismo fúngico por compostos voláteis e difusíveis

Não houve diferença na atividade antagônica em placas para avaliação de compostos difusíveis (modo como tem sido feito todos os experimentos) e em placas para detecção de antagonismo por compostos voláteis (Figura 3.36).





3.3.9.1.5 Atividade antimicrobiana de <u>B. seminalis</u> contra leveduras e bactérias patogênicas

A atividade antagônica de TC3.4.2R3 é positiva para *C. albicans*, porém não sofre alteraçõs nas linhagens mutantes SST57 e SST58 (Figura 3.37). O crescimento das linhagens de *S. cerevisiae* (Tabela 3.1) não foi afetado pela presença de TC3.4.2R3, assim como as demais bactérias patogênicas humanas, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (Tabela 3.1) também não foram inibidas por TC3.4.2R3.

Figura 3.37 - Atividade antimicrobiana de TC3.4.2R3 contra *C. albicans* observada após 24 h de incubação de *C. albicans* NCTC 3179 com inóculos de *B. seminalis* inativadas a baixa temperatura. As linhagens testadas foram: C- controle negativo; 1-TC3.4.2R3; 2-LMG19587; 3-LMG24067; 4-LMG24271; 5-LMG24272; 6-LMG24273; 7-SST57 e 8-SST58. Foi considerada atividade antimicrobiana positiva, o halo de inibição de pelo menos 1 mm, foi observado um halo de inibição de 7 mm para o TC3.4.2R3 e também para os mutantes SST57 e SST58 (destacados por setas brancas)



FONTE: Tsui (2021)

3.3.9.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Os oito antibióticos de diferentes classes testados nas concentrações (µg) foram ampicilina (10) - classe das penicilinas, canamicina - (30) classe dos aminoglicosídeos, cloranfenicol (30) - classe cloranfenicol, tetraciclina (30) - classe das tetraciclinas, trimetoprima (5) - classe trimetoprima, polimixina B (300) classe da polimixina, meropenen (10) classe dos carbapenems e ceftazidima (30) - classe das cefalosporinas.

Pode-se observar que as linhagens de *B. seminalis* foram inibidas na presença de discos de cloranfenicol (30 µg), meropenen (10 µg) e ceftazidima (30 µg), conforme está apresentado na figura 3.38. A avaliação do diâmetro do halo de inibição foi realizada com base no padrão determinado pela EUCAST - *European Commiteee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2021), utilizando o valor tabelado do cloranfenicol para bactérias do Bcc (disponível apenas para os antibióticos cloranfenicol e trimetroprima) e para os antibióticos meropenen e ceftazidima foi utilizada a tabela para *Pseudomonas* spp.

Um halo maior ou igual a 50 mm para os antibióticos cloranfenicol e ceftazidima é considerado susceptível (S), e para meropenen, um halo maior ou igual a 24 mm é considerado susceptível (S). A ausência de halo ou halos menores para os antibióticos mencionados anteriormente foi considerado como resistente (R) (Tabela 3.18).

observadas diferenças no padrão de susceptibilidade das outras cinco linhagens de *B. seminalis* da coleção da BCCM. A organização dos discos de antibióticos está representada pela respectiva abreviação do antimicrobiano seguida da concentração do mesmo presente no disco, sendo Kn30 - canamicina (30 µg), Ap10 - ampicilina (10 µg), Clo30 - cloranfenicol (30 µg), Tet30 - tetraciclina (30 µg), Tri5 - trimetoprima (5 µg), Pol300 - polimixina B, Mer10 - meropenen (10 µg) e Caz30 - ceftazidima (30 µg). A concentração dos discos de antimicrobianos utilizadas no presente teste está de acordo com o padrão determinado pela EUCAST - *European Commiteee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2021). Para cloranfenicol e ceftazidima halos \geq 50 mm correspondem ao perfil de susceptibilidade (S)



FONTE: Tsui (2021)



	Perfil de susceptibilidade								
Linhagem de <i>B. seminalis</i>	Ampicilina	Canamicina	Cloranfenicol	Tetraciclina	Trimetoprima	Polimixina B	Meropenem	Ceftazidima	
TC3.4.2R3	R	R	R	R	R	R	S	R	_
SST57	R	R	R	R	R	R	S	R	
SST58	R	R	R	R	R	R	S	R	
LMG19587	R	R	R	R	R	R	S	R	
LMG24067	R	R	R	R	R	R	S	R	
LMG24271	R	R	R	R	R	R	S	R	
LMG24272	R	R	R	R	R	R	S	R	
LMG24273	R	R	R	R	R	R	S	R	

R, resistente e S, susceptível

A sobrevivência das linhagens na presença do antibiótico polimixina B, mostrou-se significativamente diferente nas concentrações de 20 µg/mL e 400 µg/mL, em que SST58 tem maior porcentagem de sobrevivência, seguida de SST57 e TC3.4.2R3 (Figura 3.39A). A linhagem mutante SST57 apresenta maior resistência ao antibiótico polimixina B nas concentrações de 20-150 e 400 µg/mL. Na presença do antibiótico ampicilina, nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL, TC3.4.2R3 tem maior porcentagem de sobrevivência do que o mutante SST57. Não houveram diferenças na porcentagem de sobrevivência de TC3.4.2R3 e SST58 em nenhuma das concentrações avaliadas (Figura 3.39B). Enquanto ao antibiótico ampicilina, SST57 mostra-se resistente nas concentrações de 10, 50, 100, 150 e 250 µg/mL.

Figura 3.39 - Sobrevivência de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 na presença de antibióticos. **A.** Comparação da porcentagem de sobrevivência na presença de polimixina B dentro de cada uma das concentrações avaliadas, letras diferentes acima da barra representam diferença significativa (P<0,05) de acordo com o teste Tukey. **B.** Comparação da porcentagem de sobrevivência na presença de polimixina B dentro de cada uma das concentrações avaliadas, letras diferentes acima da barra representam diferença significativa (P<0,05) de acordo com o teste Tukey



3.3.9.3 Crescimento bacteriano de B. seminalis TC3.4.2R3 e seus mutantes

O crescimento bacteriano de TC3.4.2R3 não difere de seus mutantes, tanto pela comparação da densidade óptica (D.O._{600nm}) após 24 horas de crescimento a 28°C (Figura 3.40A) como pela curva de crescimento bacteriano em um intervalo

de 48 horas (Figura 3.40B). Não houve diferença nas curvas de crescimento de TC3.4.2R3 e seus mutantes SST57 e SST58.

Figura 3.40 - Comparação de crescimento entre linhagens TC3.4.2R3. **A.** Comparação da taxa de crescimento por meio dos valores de leitura de absorbância (D.O._{600nm}) após 24 horas de crescimento bacteriano. Letras iguais acima da barra representam ausência de diferença significativa (P<0,05) de acordo com o teste Tukey. **B.** Curvas de crescimento de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e seus mutantes SST57 e SST58. Estão apresentados os valores das leituras da absorbância (densidade óptica ao comprimento de onda de 600 nm) ± o desvio padrão em 45 horas de experimento, sendo que as leituras foram realizadas no intervalo de 1 em 1 hora. O destaque em retângulo vermelho se refere a uma segunda fase aparentemente exponencial e então seguida pela fase estacionária



3.3.9.4 Motilidade bacteriana em duas temperaturas

As linhagens TC3.4.2R3, SST57 e SST58 não apresentaram diferença na motilidade do tipo swimming a 28°C e nem a 37°C. Apenas para o mutante SST57, observa-se uma redução da motilidade do tipo swimming a 37°C em comparação àquela realizada a 28°C (Figura 3.41A). Na motilidade do tipo swarming, a 28°C observa-se que não há diferenças entre aquela realizada por TC3.4.2R3 e o mutante SST57, porém a motilidade swarming em SST58 é menor comparada à linhagem selvagem. Não há diferença na motilidade swarming entre SST57 e SST58 a 28°C. Observa-se que a 37°C ocorre uma redução de motilidade swarming nos mutantes comparada a TC3.4.2R3, sendo que em SST58 é menor do que SST57. Houve um aumento da motilidade swarming das linhagens TC3.4.2R3 e SST57 a 37°C em comparação àquela realizada a 28°C (Figura 3.41B), não sendo significativa para SST58.

Figura 3.41 - Avaliação de motilidade bacteriana do tipo **A.** swimming; e **B.** swarming em TC3.4.2R3, SST57 e SST58 a 28°C e 37°C. Gráfico à esquerda refere-se à comparação da atividade entre linhagem selvagem e seus mutantes em duas temperaturas e gráfico à direita refere-se à comparação dentre as linhagens em duas temperaturas. No gráfico à esquerda, letras diferentes acima da barra representam que houve diferença significativa entre as médias (apenas dentro da mesma temperatura avaliada). No gráfico à direita, *ns* – não houve diferença significativa e *, ** e **** - houve diferença significativa (P<0,05) de acordo com o teste Tukey. **C.** swimming em TC3.4.2R3 a 28°C e 37°C. **D.** swarming em TC3.4.2R3 a 28°C e 37°C. O círculo vermelho tracejado indicado por uma seta da mesma cor indicam o diâmetro do halo de motilidade





FONTE: Tsui (2021)

3.3.9.5 Produção de biofilme em duas temperaturas

A produção de biofilme a 28°C foi diferente para as três linhagens, houve uma redução na produção de biofilme dos mutantes SST57 e SST58 comparada a linhagem selvagem. A produção de biofilme do mutante SST58 foi menor do que a do mutante SST57. Não houve diferença entre as linhagens na produção de biofilme a 37°C (Figura 3.42A). A produção de biofilme foi menor a 37°C apenas para a linhagem selvagem TC3.4.2R3 (Figura 3.42B).

Figura 3.42 - Produção de biofilme. **A.** Comparação da produção de biofilme entre as linhagens TC3.4.2R3, SST57, SST58 a 28°C e 37°C. Letras diferentes acima da barra representam que houve diferença significativa entre as médias (apenas dentro da mesma temperatura avaliada). A imagem abaixo do gráfico ilustra a coloração do biofilme a 28°C (esquerda) e 37°C (direita) com cristal violeta. **B.** Comparação de produção de biofilme dentre as linhagens em duas temperaturas , ns - não houve diferença significativa e *, ** e *** - houve diferença significativa (P<0,05) de acordo com o teste Tukey



FONTE: Tsui (2021)

3.3.9.6 Detecção de produção de AHL

Não foi observada produção de violaceína nas placas para detecção de Nacil homoserina lactonas (AHL) em TC3.4.2R3 e seus mutantes, utilizando a *C. violaceum* CV026.

3.3.9.7 Avaliação de tolerância a estresses ambientais

Não houve diferença na tolerância a estresses do tipo ácido, osmótico, salino e a detergente entre as linhagens TC3.4.2R3, SST57 e SST58 (Figura 3.43). Além disso a sobrevivência de *B. seminalis* de modo geral sob esses fatores de estresse é de 80-90%, mostrando-se tolerante a esses estresses.

Figura 3.43 - Tolerância a estresses ambientais do tipo, ácido, osmótico, salino e a detergente. *ns* - não houve diferença significativa (P<0,05) de acordo com o teste Tukey



3.3.9.7.1 Estresse oxidativo induzido por H₂O₂

(i) Experimento 1

A concentração de H₂O₂ utilizada (9,8 M) foi tão alta que não permitiu nenhum crescimento bacteriano, não sendo possível utilizar essa metodologia para avaliar o estresse oxidativo em TC3.4.2R3 e seus mutantes.

(ii) Experimento 2

No experimento de estresse oxidativo em placas concendo discos submergidos em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), não foi observada a formação de "halo de inibição de crescimento" bacteriano em torno dos discos de concentração 0,005 mM, 0,05 mM, 0,5 mM e 5 mM. Na linhagem selvagem, TC3.4.2R3, não foi observada formação de halo em torno do disco de 50 mM, mas em SST57 e SST58 foi possível observar a formação de um pequeno "halo de inibição de crescimento". A tolerância de TC3.4.2R3 não difere estatisticamente dos mutantes, SST57 e SST58, de acordo com esse teste realizado (Figura 3.44).

Figura 3.44 - Estresse oxidativo induzido por H_2O_2 utilizando discos submergidos em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. **A.** Análise estatística dos halos formados em TC3.4.2R3, SST57 e SST58 utilizando discos de 50 mM, 500 mM e 5000 mM de H_2O_2 . **B.** Presença de halos envolta dos dicos de 50 mM nas linhagens mutantes, SST57 e SST58. **C.** Formação de halos em TC3.4.2R3, SST57 e SST58 na presença de discos de H_2O_2 a 500 mM, 5000 mM e ausência de H_2O_2 (controle). Círculo vermelho tracejado e seta destacam o diâmetro do "halo de inibição de crescimento". *ns* - não houve diferença significativa e *** - houve diferença significativa (P<0,05) de acordo com o teste Tukey, não houve formação de halo em TC3.4.2R3 na presença de discos de 50 mM de H_2O_2





FONTE: Tsui (2021)

(iii) Experimento 3

As culturas de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 foram incubadas em diferentes concentrações de H_2O_2 (200 μ M, 300 μ M, 400 μ M, 500 μ M, 600 μ M, 700 μ M, 800 μ M, 900 μ M, 1.000 μ M, 1.500 μ M e 2.000 μ M).

Não foi observada diferença na tolerância de TC3.4.2R3 em relação aos mutantes, SST57 e SST58 (Figura 3.45A). A avaliação individual do crescimento das culturas em diferentes concentrações de H_2O_2 permitiu observar que a linhagem SST57 é mais tolerante à H_2O_2 , (apresentando alteração significativa na sobrevivência a partir de 1.000 µM de H_2O_2), seguida da linhagem selvagem TC3.4.2R3 (900 µM), sendo SST58 a linhagem mais sensível ao peróxido de hidrogênio (800 µM) (Figura 3.45B). Sendo assim, a tolerância das linhagens ao peróxido de hidrogênio é crescente na seguinte ordem SST58, TC3.4.2R3 e SST57.

Figura 3.45 - Estresse oxidativo induzido por H_2O_2 incubando-se culturas de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 em diferentes concentrações de $H_2O_2(200-2.000 \ \mu\text{M})$. **A.** Comparação da porcentagem de sobrevivência das linhagens quando incubadas em diferentes concentrações. *ns* - não houve diferença significativa (P<0,05) de acordo com o teste Tukey. **B.** Comparação da porcentagem de sobrevivência das linhagens individualmente, sob diferentes concentrações. Nessa análise, considerou-se como "a" todas as porcentagens de sobrevivência que não foram significativamente diferentes daquela observada em 200 μ M, o destaque na concentração na respectiva cor que representa cada uma das linhagens (amarelo para TC3.4.2R3) refere-se à primeira concentração em que houve redução significativa na porcentagem de sobrevivência (letra "b"), em seguida concentrações superiores que reduziram a porcentagem de sobrevivência estão acompanhadas de letras "c" e/ou "d"

247



3.3.9.8 Produção de toxoflavinas

Não houve produção de toxoflavinas tanto na linhagem selvagem TC3.4.2R3 e, como em seus mutantes SST57 e SST58.

3.3.9.9 Interação com *B. gladioli* ORQF-04F, causadora de necrose foliar em *Oncidium* Aloha Iwanaga

3.3.9.9.1 Avaliação da atividade antagônica de B. seminalis contra B. gladioli ORQF-04F por meio de metodologia cross-streak

O ensaio realizado pela metodologia *cross-streak* não permitiu verificar se houve modificação na atividade inibitória de *B. seminalis* TC3.4.2R3 (Figura 3.46), já que não foi observada inibição nem mesmo com esta linhagem descrita como potencial agente de controle biológico para *B. gladioli* ORQF-04F (MANO, 2011). A metodologia *cross streak* não foi satisfatória para a detecção de atividade antagônica de *B. seminalis* contra o patógeno *B. gladioli*.

Figura 3.46 - Avaliação da atividade antagônica de *B. seminalis* contra *B. gladioli* ORQF-04F por meio de metodologia *cross-streak*



FONTE: Tsui (2021)

3.3.9.9.2 Avaliação da atividade antagônica de B. seminalis contra B. gladioli ORQF-04F por meio de metodologia spot-on-the-lawn

Não foram observadas diferenças na atividade antagônica/produção de compostos antimicrobianos entre as linhagens de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e seus mutantes SST57 e SST58 pelo método *spot-on-the-lawn* (Figura 3.47 e Tabela 3.19).

Figura 3.47 - Avaliação da atividade antagônica de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 contra *B. gladioli* ORQF-04F por meio de metodologia *spot-on-the-lawn*



Tabela 3.19 - Avaliação da atividade antagônica de *B. seminalis* TC3.4.2R3 e seus mutantes contra *B. gladioli* ORQF-04F *in vitro*

Linhagem	Diâmetro do halo	Test <i>t</i> (P<0,05)
	(mm)	
TC3.4.2R3	26,00 ± 0.2160	ns
SST57	29,25 ± 0.2175	ns
SST58	19,75 ± 0.1250	ns

ns, não significativo

3.3.9.9.3 Avaliação da atividade antagônica de B. seminalis contra B. gladioli ORQF-04F por meio do controle necrose foliar de orquídea

Não houve diferença na atividade antagônica de TC3.4.2R3 comparada a seus mutantes SST57 e SST58 por meio do ensaio de controle biológico de necrose foliar de orquídea. Qualitativamente, tanto TC3.4.2R3 como seus mutantes SST57 e SST58 inibem o desenvolvimento de lesões características de necrose foliar em orquídea (Figura 3.48).

Figura 3.48 – Ensaio de controle da necrose foliar de orquídea por TC3.4.2R3, SST57 e SST58 utilizando a linhagem *B. gladioli* ORQF-04F como patógeno. A primeira imagem corresponde ao controle positivo (inóculo de ORQF-04F em fragmento foliar de orquídea). Na sequência são suspensões de ORQF-04F juntamente a TC3.4.2R3, SST57 e SST58



FONTE: Tsui (2021)

3.3.9.10 Extração de LPS e análise por eletroforese em gel de SDSpoliacrilamida

Foi observado que as linhagens de *B. cenocepacia* K56-2 e *B. seminalis* TC3.4.2R3 expressaram o padrão típico de corrida de bandas de uma molécula de LPS completa, apresentando o polissacarídeo antígeno-O de comprimento variável. Não foram observadas diferenças em seu aspecto, forma, comprimento ou intensidade na região do antígeno-O, bem como do lipídeo A junto ao oligossacarídeo core de TC3.4.2R3, e seus mutantes SST57 e SST58 (Colunas 1-3 na figura 3.490). O cluster n-TASE não afeta a síntese de LPS, uma vez que ambos os mutantes possuem o mesmo padrão de migração que a linhagem selvagem TC3.4.2R3 (Figura 3.49).

Figura 3.49 - Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida da molécula de LPS das linhagens de *B. seminalis*



As linhagens LMG19587 e LMG24271 (colunas 4 e 6 na figura 3.49) apresentaram um padrão de migração semelhante, tendo a banda do lipídio A apresentado a mesma velocidade e intensidade de migração. Entretanto, o padrão de antígeno-O é bastante distinto daquele observado em TC3.4.2R3, que mostra um número mais definido de bandas. As linhagens LMG19587 e LMG24271 não apresentaram um número claro de bandas para a migração do antígeno-O.

As linhagens LMG24272 e LMG24273 (colunas 7 e 8 na figura 3.49) mostraram um padrão de migração do antígeno-O muito semelhante, no entanto, a região do antígeno-O e a região do lipídeo A e core não estão muito bem separadas. Comparado a outras linhagens, a região do antígeno-O aparentemente tem maior velocidade de migração nessas duas linhagens. Na linhagem LMG24272 é possível ver uma banda de intensidade mais alta que representa o lipídio A, pois para a LMG24273 esta banda não está presente, ao invés disso, são observadas duas bandas fracas na mesma velocidade de migração do lipídio A.

Finalmente, a linhagem LMG24067 (coluna 5 na figura 3.49) mostrou um padrão de migração de LPS completamente distinto, existe uma única banda que representa o lipídeo A-core de migração mais lenta, localizada em uma altura maior,
comparada às outras bandas. Para esta linhagem não foi observada a banda do antígeno-O detectável, o que significa que esta estrutura (antígeno-O) pode não estar presente em LMG24067.

3.3.9.11 Infecção em Galleria mellonella

3.3.9.11.1 Determinação de carga bacteriana para experimento de infecção de G. mellonella

(i) Experimento 1

O experimento de determinação da concentração mínima (Figura 3.50) para causar mortalidade de 50% das lagartas, utilizando diferentes concentrações de TC3.4.2R3 determinadas pela medição da densidade ótica (O.D._{600nm}) sendo, 0,1; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5 e 2,0 não permitiu definir a mínima concentração para causar mortalidade de 50% das lagartas. Possivelmente devido ao valor similar de unidades formadoras de colônias entre uma concentração e outra (determinada pela leitura de densidade ótica).

Foi observado que 24 horas após inoculação, mais de 50% das lagartas já estavam mortas a partir da suspensão a O.D._{600nm} 0,8. As suspensões na concentração de O.D._{600nm} 1,5 e 2,0 apresentaram 100% de mortalidade após 24 horas (Figura 3.50). As lagartas das diluições menores (O.D._{600nm} 0,1 e 0,5) não apresentaram pigmentação e tinham movimentos lentos, mas estavam todas vivas. Após 48 horas, todas as lagartas já haviam morrido, não sendo possível continuar a avaliação da concentração de *B. seminalis* TC3.4.2R3 para o experimento de infecção.

Figura 3.50 - Determinação de carga bacteriana para experimento de infecção de *G. mellonella*, por meio de avaliação da mortalidade após 24 horas de inoculação. Observa-se que mais de 50% das lagartas já estavam mortas a partir da suspensão a O.D.600nm 0,8. As suspensões na concentração de O.D.600nm 1,5 e 2,0 apresentaram 100% de mortalidade de lagartas



(ii) Experimento 2

No experimento 2 para determinação da carga bacteriana para realização do experimento de infecção de *G. mellonella*, foi observado que a diluição de 10^{-5} e 10^{-6} (com 10^3 e 10^2 UFC/mL, respectivamente) causaram a morte de pelo menos 50% das lagartas após 120 horas de infecção (Tabela 3.20). As diluições bacterianas maiores a 10^{-5} causaram a mortalidade de 50% das lagartas entre 24 e 48 horas após infecção (Tabela 3.20), não sendo ideal para avaliação de curva de mortalidade devido à infecção bacteriana. Com esse resultado, foi determinado que a diluição bacteriana de TC3.4.2R3 a ser utilizada para experimentos de infecção com *G. mellonella* seria de 10^{-6} (~ 10^2 UFC/mL). Além disso, foi possível observar o desenvolvimento do processo infeccioso causado por TC3.4.2R3 em *G. mellonella*, expresso pela melanização da superfície das lagartas (Figura 3.51).

Tabela 3.20 - Avaliação de mortalidade de *G. mellonella* utilizando diferentes diluições bacterianas de TC3.4.2R3. "0" - indica a não contabilização de morte de lagartas; "-" indica a mortalidade do número total de lagartas avaliadas naquele tempo/diluição; demais números indicam a quantidade de lagartas mortas contabilizadas naquele tempo/diluição

Tempo	Diluição bacteriana de TC3.4.2R2 a partir de O.D.600nm 1,0								
após	Controle	PBS	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10-4	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
infecção			UFC/mL correspondente a diluição						
			10 ⁷	106	105	104	10 ³	10 ²	10 ¹
24 h	0	0	9	6	1	0	1	0	0
48 h	0	0	1	4	6	6	2	0	0
72 h	0	0	-	-	3	2	2	2	1
96 h	0	0	-	-	-	2	2	4	3
120 h	0	0	-	-	-	-	0	1	2
144 h	0	0	-	-	-	-	0	0	0

Figura 3.51 - Desenvolvimento da infecção em *G. melonella* causada por TC3.4.2R3. 1- Lagarta viva sem sinal de melanização; 2- primeiros sinais de melanização na superficie do corpo, lagarta viva; 3- praticamente metade da superfície do corpo melanizada, presença de movimentos lentos, lagarta viva; 4- total melanização da superfície do corpo, ausência de qualquer movimento, rigidez do corpo é perdida (lagarta flácida), lagarta morta; 5- nível máximo de melanização (corpo todo com pigmentação escura), lagarta morta



3.3.9.11.2 Infecção de G. mellonella com B. seminalis TC3.4.2R3 e mutantes

A mortalidade em *G. mellonella* provocada pela infecção com TC3.4.2R3 selvagem ou mutantes, SST57 e SST58 não é significativamente diferente em nenhum dos tempos após infecção, avaliados (Figura 3.52).

Figura 3.52 - Infecção de TC3.4.2R3 e mutantes em *G. mellonella*. **A.** Comparação de número de lagartas mortas em 24, 48, 72, 96 e 120 horas após infecção. Destaque à direita para o aspecto de lagartas consideradas vivas e mortas (melanização e ausência de resposta de movimento a estímulos). *ns* - não houve diferença estatística (P<0,05) de acordo com o teste Tukey. **B.** Curva de sobrevivência de *G. mellonella* após infecção com linhagens de *B. seminalis*, TC3.4.2R3 e seus mutantes SST57 e SST58 (N=60), ausência de diferença significativa entre linhagens bacterianas de acordo com o teste de Log-rank (Mantel-Cox)



3.3.9.11.3 Experimento piloto para extração de hemolinfa

O isolamento de TC3.4.2R3 da hemolinfa de *G. mellonella* em 1, 6 e 24 horas após infecção foi possível, a contagem de UFCs permitiu determinar que há um crescimento bacteriano dentro de *G. mellonella* (Figura 3.53). Não foi realizada a contagem de UFCs que cresceram nas placas, pois o objetivo foi apenas otimizar a metodologia e verificar a viabilidade de isolamento de TC3.4.2R3 de hemolinfa. Além disso, na *timepoint* de 24 horas, não é observado nenhum crescimento bacteriano sobre meio LBA suplementadas com espectinomicina 300 µg/mL, quando a hemolinfa dos tratamentos "controle" e "PBS" são semeados. Mostrando assim, a eficácia do uso do antibiótico nessa concentração para a seleção de *Burkholderia* a partir da hemolinfa.

A realização de PCR com primers que anelam no gene Bsem_02858 (RT-PCR_2858_Fw e RT-PCR_2858_Rv) resultou na amplificação para todas 8 colônias escolhidas aleatoriamente em placas de cultivo das três *timepoints* avaliadas (1, 6 e 24 horas após infecção) (Figura 3.53). Esse resultado mostra que as colônias bacterianas provenientes de placas de isolamento bacteriano da hemolinfa de *G. mellonella* são de TC3.4.2R3.

Figura 3.53 - Resultado do experimento para extração de hemolinfa de *G. mellonella*. **A.** Isolamento de TC3.4.2R3 da hemolinfa de *G. mellonella* em 1, 6 e 24 horas após infecção (h.a.i.). **B.** Eletroforese de 8 colônias escolhidas aleatoriamente de cada uma das placas de 1, 6 e 24 h.a.i. Observa-se produto de PCR confirmando a identidade das colônias isoladas da hemolinfa, como TC3.4.2R3. **C.** Utilização de ácido ascórbico (1mg/mL) para preservação da hemolinfa (tubo à esquerda) e hemolinfa na ausência de ácido ascórbico (tubo à direita). Imagem capturada após 10 minutos da extração da hemolinfa de *G. mellonella*





FONTE: Tsui (2021)

3.3.9.11.4 Sobrevivência bacteriana em hemolinfa

Não houve diferença na sobreviência bacteriana de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 nas *timepoints* 1 h.a.i., 6 h.a.i., 12 h.a.i. e 24 h.a.i (Figura 3.54). Na *timepoint* de 48 h.a.i., foi observada uma redução de UFCs de SST58 comparado com TC3.4.2R3 e SST57.

Figura 3.54 - Comparação de sobrevivência dee TC3.4.2R3, SST57 e SST58 em hemolinfa de *G. mellonella*, após 1 hora, 6 horas, 12 horas, 24 horas e 48 horas de infecção



3.3.9.11.5 Detecção bacteriana por PCR

A PCR realizada com o gDNA extraído de lagartas infectadas com TC3.4.2R3 e SST57 (vivas e mortas) utilizando os primers RT-PCR_2858_Fw e RT-PCR_2858_Rv resultou em produtos de PCR do tamanho esperado. A PCR dos tratamentos controles "PBS" e "controle" (sem injeção) não resultou em nenhum produto de PCR, como esperado, já que nesses tratamentos as lagartas não foram infectadas com bactéria. O gDNA extraído de lagartas infectadas com SST58 (vivas e mortas) foi utilizado para PCR com os primers RT-PCR_2857_Fw e RT-PCR_2857_Rv, resultando também em produtos de tamanho esperado tanto em lagartas vivas como mortas. Foi possível obter produtos de PCR para todas as lagartas infectadas com as linhagens bacterianas testadas, utilizando primers específicos para a linhagem TC3.4.2R3. Os primers RT-PCR_2857_Fw e RT-PCR_2857_Rv foram utilizados para lagartas infectadas com SST58, pois esse mutante não possui a região gênica onde os primers RT-PCR_2858_Fw e RT-PCR_2858_Rv anelam (utilizado para todos os outros gDNAs) (Figura 3.55). Esse resultado mostra uma possível aplicação desses primers para detecção bacteriana em *G. mellonella* infectadas por qPCR.

Figura 3.556 - Detecção de TC3.4.2R3, SST57 e SST58 em gDNA extraído de lagartas vivas e mortas de *G. mellonella*. M- marcador molecular 1 Kb plus; 1-3 - gDNA de lagartas inoculadas com tampão PBS; 4-6 - gDNA de lagartas não inoculadas (controle); 7-9 - gDNA de lagartas vivas inoculadas com TC3.4.2R3; 10-12 - gDNA de lagartas mortas inoculadas com TC3.4.2R3; 13-15 - gDNA de lagartas vivas inoculadas com SST57; 16-18 - gDNA de lagartas mortas inoculadas com SST57; 19-21 - gDNA de lagartas vivas inoculadas com SST58; 22-24 - gDNA de lagartas mortas inoculadas com SST58



FONTE: Tsui (2021)

3.4 Discussão

O gênero *Burkholderia* abrange espécies de ampla distribuição em ambientes, como no solo (rizosfera) e água. Algumas espécies podem se associar de maneira benéfica a plantas, enquanto outras são patogênicas. Há também aquelas que agem como patógenos oportunistas, causando doenças em humanos e animais, como *Burkholderia cenocepacia* (COMPANT *et al.*, 2008; MAHENTHIRALINGAM; BALDWIN; DOWSON, 2008; VANDAMME; DAWYNDT, 2011). *Burkholderia* apresenta alto nível de resistência intrínseca a uma gama diversa de antibióticos (AARON 2000; NZULA; VANDAMME; GOVAN, 2002), fato que dificulta a sua manipulação genética, representando um impedimento no avanço da compreensão da sua fisiologia e patogênese (AUBERT; HAMAD; VALVANO, 2014).

Umas das razões pelas quais existe essa complexidade na manipulação de *Burkholderia* spp. se deve à falta de marcadores de contra seleção adequados e, dependendo da espécie de estudo, nem sempre marcadores de seleção usando genes de resistência a antibióticos são permitidos (por exemplo *B. mallei* e *B. pseudomallei*) (BARRETT *et al.*, 2008).

Alguns marcadores de contra-seleção bastante utilizados em bactérias, incluem *rpsL*, *tetAR*, *pheS*, *thyA*, *gata-1*, *ccdB* e o mais comum *sacB* (REYRAT *et al.*, 1998). Apesar de um número considerável de estudos utilizando o marcador *sacB* em *Burkholderia* spp. (BROWN *et al.*, 2004; CHAN; CHUA, 2005; ESSEX-LOPRESTI *et al.*, 2005; ULRICH *et al.*, 2005), ele não é o mais apropriado e mostra-se ineficaz em muitos laboratórios que trabalham com a manipulação genética de espécies de *Burkholderia* (BARRETT *et al.*, 2008).

Apesar de altamente desafiadora, a manipulação genética de *Burkholderia* spp. vem sendo alcançada na última década, por meio de diversos sistemas de mutagênese especificamente adaptados ao gênero (principalmente à *B. cenocepacia*). A maioria desses sistemas é baseada na estratégia de inserção de plasmídeos não replicativos que se integram de forma sítio-dirigida no cromossomo via recombinação homóloga, resultando em mutantes polares (FLANNAGAN et a., 2007), não-polares (FLANNAGAN; VALVANO, 2008) e/ou condicionais (ORTEGA *et al.*, 2007). Além disso, sistemas de deleção gênica sem cicatriz (*unmarked deletion*)

já foram descritos para o gênero *Burkholderia* (FLANNAGAN *et al.*, 2008) e também para *B. pseudomallei* (CHOI *et al.*, 2008; LÓPEZ *et al.*, 2009).

No presente estudo, diversas foram as metodologias empregadas para a construção de mutantes de TC3.4.2R3 (item 3.3.2). Em algumas delas, a dificuldade se devia à procedimentos moleculares como construção do cassete de mutagênese, obtenção do vetor de mutagênese e em outros, tratava-se do desconhecimento da capacidade de reparo de DNA após uma DBS (*double strand break*), houve também a associação da ineficácia de métodos geralmente utilizados com *Burkholderia* e que não funcionaram para *B. seminalis*, devido à possível baixa taxa de recombinação homóloga.

Apesar da disponibilidade de métodos de deleção gênica sem cicatriz (I-Scel endonuclease e CRISPR/Cas), a mutagênese de *B. seminalis* TC3.4.2R3 no presente trabalho só foi alcançada por meio do sistema de inserção de um plasmídeo suicida (pGPΩTp) que se integrou especificamente no cromossomo via recombinação homóloga, resultando em mutantes polares de TC3.4.2R3 para os genes Bsem_02857 e Bsem_02858, que foram devidamente confirmados por PCR, sequenciamento e RT-PCR (itens 3.3.6.5 e 3.3.8).

Devido à sua descrição muito recente (VANLAERE *et al.*, 2008), a maioria dos estudos que envolvem a espécie *B. seminalis* tratam da descrição e identificação de novos isolados (LI *et al.*, 2010; HALL *et al.*, 2015), do potencial como agente antagônico (LOU *et al.*, 2011; IBRAHIM *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2020), ou como agente promotor de crescimento vegetal (TALLAPRAGADA *et al.*, 2015; PANHWAR *et al.*, 2017) e até o momento, não foram encontrados estudos que descrevessem a mutagênese em *B. seminalis* via métodos de deleção gênica sem cicatriz. Assim, não se sabe se as dificuldades, além daquelas descritas para o gênero *Burkholderia*, encontradas na presente etapa deste trabalho se devem a uma característica que se aplica apenas à *B. seminalis* TC3.4.2R3.

O mutante de transposon M30 (interrupção do gene Bsem_02858), apresentou atividade antifúngica defectiva contra o fungo *F. oxysporum* (NEVES, 2011). No presente estudo, o antagonismo de TC3.4.2R3 e M30 mostrou-se divergente, pois o mutante M30 não apresentou atividade defectiva contra *F. oxysporum*. Devido à instabilidade genética de mutantes de transposon (ROUW, 2008), a geração de mutantes do gene Bsem_02858 bem como de outros gene do cluster n-TASE tornou-se um critério fundamental e muito necessário para a confirmação da possível relação desse cluster com a atividade antagônica de TC3.4.2R3 contra *F. oxysporum*.

Gonçalves et al. (2019) avaliou a capacidade de antagonismo de *B. seminalis* TC3.4.2R3 contra os fitopatógenos *F. oxysporum, C. paradoxa, C. fimbriata* e *Colletotrichum* spp. a 28°C e 37°C, e observou que ocorreu uma redução na capacidade de inibição fúngica a 37°C. Os resultados apresentados neste estudo, mostram que a atividade antagônica de TC3.4.2R3 também apresentou redução significativa contra os fungos WLA-FP12, WLA-FP15, WLA-FP17, WLA-FP21 e WLA-FP26. *Fusarium* spp. Pode-se dizer que a temperatura é um fator que altera a capacidade de inibição fúngica de TC3.4.2R3 e seus mutantes contra algumas linhagens de *Fusarium*, porém os genes Bsem_02857 e Bsem_02858 não apresentam correlação à capacidade antagônica contra fungos fitopatogênicos em TC3.4.2R3. Além disso, não houve diferenças entre a atividade antagônica de TC3.4.2R3 e seus mutantes contra fungo fungo de Status contra *C. albicans*, portanto a inibição desse fungo leveduriforme também não se deve ao cluster n-TASE.

Uma das bem conhecidas funções da membrana externa de Gram-negativas, é a tolerância a estresses ambientais e antibióticos (LEE *et al.*, 2019). O n-TASE está localizado a 8,2 Kb do cluster de biossíntese do antígeno-O (Bsem_2830 a Bsem_02846) que compõe o LPS. A análise do perfil de LPS das linhagens selvagem e mutantes de TC3.4.2R3 (item 3.3.9.10) mostrou que não existem diferenças na região do antígeno-O e do lipídeo A e do oligossacarídeo core entre a linhagem selvagem e os mutantes. Resultados condizentes com o que foi observado com a tolerância a estresses ambientais. As mutações nos genes Bsem_02857 e Bsem_02858 não provocaram alterações significativas na tolerância de TC3.4.2R3 a diversos tipos de estresses ambientais, como ácido, salino, osmótico, oxidativo e a detergente. Lee *et al.* (2019) mostraram que mutações nos genes que compõem a via biossintética do antígeno-O em *B. glumae* (cluster wbiFGHI) não causaram modificações na capacidade de tolerância a estresses ambientais. Em TC3.4.2R3 foi observado que os genes do cluster n-TASE apesar de estarem muito próximos do cluster de biossíntese do antígeno-O, não estão correlacionados à sua biossíntese, visto que não foram observadas diferenças na estrutura do antígeno-O em SST57 e SST58, confirmadas pela ausência de alteração na capacidade de tolerar estresses ambientais. Pode-se dizer ainda, que não há influência dos genes do n-TASE na biossíntese da porção do lipídeo A e oligossacarídeo coree do LPS, visto que alterações nessa porção refletiriam em perda da tolerância a estresses ambientais como descreveram Lee *et al.* (2019) para *B. glumae*.

Peptídeos antimicrobianos (APs) catiônicos e polimixinas são um grupo de antibióticos de ocorrência natural (YEAMAN; YOUNT, 2007) que também apresentam função imunomodulatória (LAI; GALLO, 2009). Dentre os diversos mecanismos de resistência a antibióticos em Gram-negativas, a alteração da molécula do LPS presente na membrana externa está entre elas, reduzindo o acesso de APs e polimixinas a para a membrana interna (GUO *et al.*,1998; TAMAYO *et al.*, 2005). Em *B. cenocepacia* a extrema resistência a APs e polimixinas (valor de MIC *minimal inhibitory concentration* > 500 μg/mL) depende primariamente da integridade da membrana externa constituída pelo LPS (LOUTET; VALVANO, 2011).

Em TC3.4.2R3 foi observado que o MIC₅₀ de polimixina B é 150 µg/mL sendo que para *B. cenocepacia* J2315, o valor de MIC₅₀ de polimixina B é acima de 512 µg/mL (THWAITE *et al.* 2009). Assim, TC3.4.2R3 não se encaixa como linhagem extremamente resistente a APs e polimixinas (MIC₅₀ > 500 µg/mL) (LOUTET; VALVANO, 2011). O mutante SST57 quando comparado a TC3.4.2R3 apresentou maior resistência a polimixina B na concentraçõs de 20-150 e 400 µg/mL, fora isso, não foram observadas modificações na estrutura do LPS de ambas as linhagens, que pudesse justificar a alteração no perfil de resistência a polimixina B.

Em Gram-negativas, o açúcar Ara4N (L-4-amino-4-deoxi-L-arabinose) é sintetizado e adicionado ao lipídeo A do LPS, sendo responsável pelo aumento da resistência microbiana a APs e polimixinas (NUMMILA *et al.*,1995; GUNN *et al.*,1998; ERNST *et al.*,1999; WINFIELD *et al.*,2005). No entanto na maioria das bactérias Gram-negativas, a síntese do Ara4N é dispensável e muitas vezes ele nem é encontrado no lipídeo A. Não se sabe se TC3.4.2R3 sintetiza esse açúcar, porém esse aumento de resistência do mutante SST57 pode estar associado a alteração da via biossintética do açúcar Ara4N, aumentando então sua resistência a polimixina B. Ressaltando-se que o mutante SST57 é polar, assim o efeito "aumento de

resistência" a polimixina B se deve a algum dos genes do cluster n-TASE. Provavelmente devido ao Bsem_02857 (glicosiltransferase), visto que o mutante SST58 (mutação do gene Bsem_02858, efeito polar nos genes Bsem_02859 e Bsem_02860) não provoca o mesmo aumento de resistência.

A resistência do mutante SST58 mostrou-se igual a de TC3.4.2R3, com exceção de algumas poucas concentrações de polimixina B (20 e 400 µg/mL), mostrando-se mais resistente. Em *B. cenocepacia* a síntese e transferência do açúcar Ara4N é constitutiva e essencial para a espécie, possivelmente justificando a extrema resistência à polimixinas (MIC₅₀ >500 µg/mL). A rota *udg* responsável pela síntese do açúcar Ara4N é composta pelos genes essencials *udg*_{BCAL2946}, *udg*_{BCAL0855}, sendo *udg*_{BCAL2946} necessário para a resistência a polimixina B. A síntese de Ara4N se baseia na conversão de *UDP-glucose* para *UDP-glucoronic acid*, catalisado pela proteína *UDP-glucose dehydrogenase* (RAETZ; WHITFIELD, 2002). Pode ser que o gene Bsem_02857 esteja relacionado a via biossintética de Ara4N, de forma que quando esse deixa de ser expressado, ocorre um aumento da produção de Ara4N, aumentando a resistência de TC3.4.2R3 à polimixina B. Loutet e Valvano (2011) propuseram um modelo de resistência a polimixina B. Loutet e Valvano (2011) propuseram um modelo de resistência a polimixina fue envolve vários mecanismos de resistência, cada um exercendo um pequeno papel na resistência, mas como um todo contribuem substancialmente para a alta resistência total do organismo.

A motilidade do tipo swimming não tem uma correlação com o processo infeccioso nas principais espécies de patógenos Bcc oportunistas, *B. cenocepacia* e *B. multivorans*. Linhagens que apresentam esse tipo de motilidade (halo de swimming maior que 10 mm) e linhagens onde essa motilidade é ausente foram recuperadas de amostras de clínicas de infecções pulmonares de pacientes com fibrose cística (ZLOSNIK *et al.*, 2014). No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas entre a motilidade de TC3.4.2R3 e seus mutantes em nenhuma das temperaturas avaliadas. Além disso, em TC3.4.2R3 o halo de swimming a 28°C e a 37°C não é diferente (P<0,05), a mutação nos genes Bsem_02857 e Bsem_02858 não afeta a motilidade swimming de TC3.4.2R3. No mutante SST57 ocorreu uma redução da motilidade swimming a 37°C, possivelmente devido a uma repressão de genes relacionados a motilidade flagelar com o aumento de temperatura, como descrito para a *Yersinia enterocolitica*

(ROHDE; FOX; MINNICH (1994) e para *Burkholderia glumae* (JANG *et al.*, 2014). Assim, acredita-se que se houve uma repressão de genes relacionados a motilidade flagelar com o aumento de temperatura, essa se deve ao gene Bsem_02857.

Em *B. glumae*, o quorum sensing (QS - via sistema LuxI/LuxR) é responsável por regular diversos processos celulares, entre eles, a produção e expressão dos principais fatores de virulência conhecidos, toxoflavinas e flagelo (KIM *et al.*, 2007). A motilidade swarming é importante para patogenicidade bacteriana, que demanda um funcionamento adequado do flagelo e a produção de agentes surfactantes (KEARNS, 2010), e por ser um comportamento multicelular depende da regulação via QS (DANIELS; VANDERLEYDEN; MICHIELS, 2004).

A 28°C ocorre uma redução da motilidade swarming em SST58 comparada a TC3.4.2R3, efeito não observado para SST57 cujo halo de swarming se mantém igual ao da linhagem selvagem. Acredita-se que essa diferença observada entre SST58 e TC3.4.2R3 não esteja relacionada à regulação do QS. Visto que, o QS em *B. glumae* regula positivamente a morfogênese flagelar apenas a 37°C, nessa temperatura, mutantes QS-defectivos não apresentam a estrutura do flagelo, enquanto a 28°C a motilidade swarming ocorre normalmente, independente do QS (JANG *et al.*, 2014). Em TC3.4.2R3 a motilidade a 37°C sofre uma redução gradual de SST57 com relação a TC3.4.2R3 e de SST58 comparado com SST57. Na linhagem TC3.4.2R3 foi observado um aumento da motilidade swarming a 37°C comparada a 28°C.

Além da estrutura flagelar, a produção de ramnolipídeos foi associada a motilidade do tipo swarming em *P. aeruginosa*, *B. thailandensis*, assim como em *B. glumae* (TREMBLAY *et al.*, 2007; DUBEAU *et al.*, 2009; NICKZAD; LÉPINE; DÉZIEL, 2015). TC3.4.2R3 produz ramnolipídeos que apresentam efeito antifúngico contra *F. oxysporum* (ARAÚJO; ARAÚJO; EBERLIN, 2017). O QS regula a produção de ramnolipídeos (DANIELS; VANDERLEYDEN; MICHIELS, 2004; NICKZAD; LÉPINE; DÉZIEL, 2015) e de flagelo a 37°C (JANG *et al.*, 2014), é possível que a mutação dos genes Bsem_02857 e Bsem_02858 interfira no sistema de QS, refletindo em uma redução da motilidade swarming (flagelo e ramnolipídeo dependente). Independentemente da temperatura, o mutante SST58 apresenta menor motilidade

swarming comparado a TC3.4.2R3, sendo que esta não sofre interferência da temperatura como na linhagem selvagem.

No caso de B. glumae, mutantes QS-defectivos deixam de efetuar swarming devido à falha na produção do agente surfactante, ramnolipídeo e não devido à ausência de flagelo (NICKZAD; LÉPINE; DÉZIEL, 2015) o que também foi observado em *B. cenocepacia* H111 (HUBER *et al.*, 2001). É possível que algum dos três genes interrompidos pela inserção do pGPΩTp em Bsem_02858 (Bsem_02858, Bsem_02859 e Bsem_02860) esteja envolvido indiretamente no sistema de comunicação social, mediado por QS em TC3.4.2R3. Acredita-se que a redução na motilidade de swarming em SST58 seja muito mais provável devido a produção de ramnolipídeos do que a morfogênese flagelar, já que esta é regulada pela temperatura. A produção de ramnolipídeos é uma condição necessária a motilidade swarming, visto que mutantes QS-defectivos de *B. glumae* são capazes de restaurar a motilidade swarming, na presença de ramnolipídeos sintéticos no meio de cultivo, até a temperatura de 34°C (NICKZAD; LÉPINE; DÉZIEL, 2015). Não tem estudos a respeito dos genes envolvidos na produção de ramnolipídeos em TC3.4.2R3, não sendo possível determinar se o operon rhl responsável pela produção desse surfactante em B. thailandensis, B. pseudomallei, B. glumae e P. aeruginosa (COSTA; DÉZIEL; LÉPINE, 2011; NICKZAD; LÉPINE; DÉZIEL, 2015) também está presente em TC3.4.2R3 e se é responsável pela produção de ramnolipídeos necessários ao swarming.

Os biofilmes possuem um papel importante na patogênese bacteriana, visto que são responsáveis por promover a sobrevivência bacteriana e até mesmo a colonização de hospedeiros, formando uma proteção (DUNNE, 2002; MOHAMED; HUANG, 2007) contra o mecanismo de defesa do hospedeiro (HARRISON *et al.*, 2005). A regulação da formação do biofilme é exercida pelo QS (O'TOOLE, 2000). Alguns fatores ambientais podem influenciar a produção de biofilme, incluindo tipo de açúcar disponível, temperatura e tipo de molécula AHL (*N-acyl-homoserine lactone*).

A grande maioria das bactérias Gram-negativas produzem moléculas sinalizadoras do tipo AHL visando monitorar a sua própria densidade populacional por meio do processo conhecido por QS (VENTURI *et al.*, 2004).

Consequentemente, algumas funções como fatores de virulência, necessários para a patogênese bacteriana são ativadas sob altas densidade populacionais de forma coordenada. Em B. cenocepacia o sistema QS é constituido pelo sistema Cepl/CepR, que funciona basicamente com a interação das moléculas C8-HSL (Noctanoyl homoserine lactone), C6-HSL (N-hexanoyl homoserine lactone com o regulador transcricional CepR. Espécies do Bcc apresentam o sistema Cepl/CepR QS (HUBER et al., 2004). Algumas linhagens de B. pseudomallei produzem além de C8-HSL, C10-HSL (dodecanoyl-homoserine lactone) e C12-HSL (decanoylhomoserine lactone) (RAMLI et al., 2012), dificultando a detecção dessas moléculas de AHL via ensaio com o biossensor C. violaceum CV026, visto que essas moléculas estão abaixo da detecção limiar dessa linhagem biossensora. Até o momento, não se sabe a gama de compostos AHL produzidos por TC3.4.2R3, neste estudo, foi possível determinar que compostos de C4-HSL a C8-HSL não são produzidos por TC3.4.2R3 (item 3.3.9.6), visto que o ensaio utilizando CV026 não permitiu a observação de halos de coloração roxa, indicativo de produção de violaceína, possível apenas na presença de AHL (compostos AHL com a cadeia N-acil de C₄ a C₈). A produção de violaceína pela linhagem CV026 é induzida por todos os tipos de compostos AHL com a cadeia de de N-acil variando de C₄ a C₈. Compostos AHL com a cadeia N-acil de C₁₀ a C₁₄ não conseguem induzir a produção de violaceína em CV026, portanto não é um teste recomendado no caso dessas substâncias (MCCLEAN et al., 1997). Portanto, acredita-se que o sistema QS em TC3.4.2R3 seja regulado por compostos que estejam entre os tipos C10-HSL a C14-HSL. Além disso, a molécula sintética utilizada como controle positivo no experimento de detecção de AHL é uma C12-HSL, incapaz de induzir a produção de violaceína em CV026 também.

A formação de biofilme em *B. pseudomallei* ocorre tanto a 30°C como a 37°C, sendo maior a 30°C (RAMLI *et al.*, 2012). Boddey *et al.* (2006) descreveram maior produção de biofilme de *B. pseudomallei* a 27°C, comparada a 37°C visto que o hábitat dessa espécie é o solo e portanto 27°C é a temperatura mais semelhante ao seu ambiente de ocorrência natural. De forma semelhante, no presente estudo, a formação de biofilme de TC3.4.2R3 foi significativamente maior a 28°C, comparada a 37°C. Ressaltando-se que TC3.4.2R3 é uma linhagem endofítica de raíz de canade-açúcar, sendo a temperatura 28°C mais próxima da temperatura do ambiente de onde esta bactéria foi isolada. Foi observado que mutações no cluster n-TASE resultaram em uma redução significativa (P<0,05) na produção de biofilmes a 28°C, mas nenhuma diferença foi observada a 37°C, sugerindo que o papel deste cluster é dependente da temperatura. Por outro lado, não foi observada diferença na produção de biofilme entre os mutantes SST57 e SST58 a 28°C, mostrando que este efeito observado a 28°C é resultado da mutação tanto do gene da glicosiltrasnferase quanto do gene que codifica a metiltrasnferase. Anteriormente, Gonçalves et al. (2019) avaliaram a formação de biofilme de B. seminalis TC3.4.2R3 e constaram que a 28°C, TC3.4.2R3 produz cerca de 2,5 vezes mais biofilme do que a 37°C. Muito provavelmente por *B. seminalis* TC3.4.2R3 ser um isolado ambiental e, portanto, a produção de biofilme, um fator importante para a colonização da planta hospedeira, ser maior a 28°C (GONÇALVES et al., 2019). Além disso, os autores observaram que embora o crescimento seja maior a 37°C, a produção de biofilme é menor. A formação de biofilme a 37°C entre membros do grupo do complexo Bcc é bastante variável entre isolados clínicos e de água. De forma geral, os isolados clínicos produzem muito mais biofilme do que isolados ambientais (IBRAHIM et al., 2012).

A produção de agentes biosurfactantes, formação de biofilme bem como motilidade swarming é regulada pelo QS em *B. cenocepacia* H111, no entanto a motilidade swarming é biosurfactante dependente e a produção de biofilme não. Porém a motilidade swarming não é essencial para a formação de biofilme em H111 (HUBER, *et al.*, 2001). Além disso, ela não está diretamente relacionada a virulência de *B. pseudomallei* e *B. thailandensis* em modelo animal, sendo essa, atribuída às outras estruturas bacterianas (TAWEECHAISUPAPON *et al.*, 2005).

Em TC3.4.2R3, houve um aumento significativo de swarming a 37°C que não apresentou correlação com a produção de biofilme na mesma temperatura. Além disso, a maior produção de biofilme observada em TC3.4.2R3 comparada com seus mutantes, não se reflete em maior virulência a linhagem selvagem em modelo *G. mellonella*, mostrando que para esta linhagem, a redução do biofilme não afeta a virulência à *G. mellonella*. Tanto a mortalidade bem como a recuperação de células bacterianas em hemolinfa mostram que não há diferença na infecção provocada por TC3.4.2R3 e seus mutantes em lagartas, de forma similar ao observado por Taweechaisupapon *et al.* (2005) para *B. pseudomallei* e *B. thailandensis* em modelo animal.

A espécie *B. seminalis* já foi isolada de amostras clínicas de pacientes com fibrose cística (VANLAERE *et al.*, 2008) e também já foi descrita como agente causal de podrião bacteriana de damasco (LI *et al.*, 2010). No entanto, *B. seminalis* não apresenta quaisquer genes relacionados aos principais sistemas secretores associados à virulência em plantas e mamíferos, os sistemas Tipo III, IV e VI. Visto que a linhagem não apresenta produtos de PCR positivos para genes marcadores de virulência, *cblA* e *esmR* (SAJJAN *et al.*, 1995; MAHENTHIRALINGAM; SIMPSON; SPEERT, 1997) e também não apresenta motilidade do tipo twitching, que depende exclusivamente da atividade do pilus tipo IV (T4P) (BURROWS, 2012) (dados não apresentados), TC3.4.2R3 também não é capaz de produzir toxoflavinas (item 3.3.9.8), principal fator de virulência de *B. glumae* (KIM *et al.*, 2007).

A concentração bacteriana de 10³ UFC/mL de TC3.4.2R3 causa a mortalidade <50% de lagartas de G. mellonella em 72 horas (item 3.3.9.11.1), enquanto a mesma concentração de B. cenocepacia K56-2 causa a mortalidade de 100% de lagartas de G. mellonella no mesmo tempo de ensaio (NAGUIB; VALVANO, 2018), quando 10⁷ e 10º UFC/mL de TC3.4.2R3 são inoculadas nas lagartas, observa-se 100% de mortalidade em 72 horas (item 3.3.9.11.1), sendo necessária a quantidade celular de pelo menos 1.000 vezes de TC3.4.2R3 para causar o mesmo efeito de infecção em G. mellonella com K56-2. A grande maioria das linhagens de B. cenocepacia causam mortalidade de 50% de G. mellonella em 48 horas na concentração de 10⁴ a 10⁵ UFC/mL (SEED; DENNIS, 2008), sugerindo que *B. seminalis* TC3.4.2R3 é menos virulenta a este modelo animal comparada às demais linhagens de B. cenocepacia. De acordo com a análise comparativa realizada por Seed e Dennis (2008), as espécies B. multivorans, B. stabilis, e B. vietnamiensis possuem as LD₅₀ (50% lethal dose) entre 48 e 72 horas, mais elevadas de 10⁶ UFC/mL entre as Bcc comparadas. Enquanto as diversas linhagens de B. cepacia e B. cenocepacia apresentaram as menores LD₅₀ de 3 a 10⁵ UFC/mL. Os resultados de LD₅₀ dessas espécies de Bcc refletiram proporcionalmente em experimento de patogenicidade em pulmões de camundongos (menor LD₅₀, maior patogenicidade em modelo

animal) (SEED; DENNIS, 2008). Assim, TC3.4.2R3 pode ser classificada com uma linhagem de alto valor de LD₅₀ em modelo *G. mellonella*, mais semelhante a *B. multivorans*, *B. stabilis*, e *B. vietnamiensis* do que as espécies filogeneticamente mais relacionadas, *B. cepacia* e *B. cenocepacia* e, portanto, de menor virulência a animais.

O mutante SST58 apresentou menor porcentagem de sobrevivência 48 horas após infecção. Assim, acredita-se que a expressão dos genes Bsem_02858 e seus genes *downstream* (Bsem_02859 e Bsem_02860) estejam relacionados à sobrevivência de TC3.4.2R3 em modelo *Galleria*. No entanto, a virulência dessas linhagem a *G. mellonella*, pode estar associada a outros fatores, diferentes da sobrevivência bacteriana na hemolinfa. Portanto, não foi observada uma correlação direta entre taxa de sobrevivência e mortalidade.

Não é possível inferir a respeito da capacidade de B. seminalis TC3.4.2R3 apresentar comportamento de patógeno oportunista, ou ser responsável por infecções nosocomiais em ambiente hospitalar baseado apenas nos resultados de infecção em modelo G. mellonella. Uma vez que patogenicidade de bactérias do Bcc não é espécie-dependente, já que todas as espécies já foram encontradas em amostras recuperadas de pacientes de fibrose cística (SPEERT *et al.*, 2002). Apesar da ausência de marcadores de virulência em TC3.4.2R3, alto valor de LD₅₀ em infecção de G. mellonella não é recomendável considerar essa linhagem como "segura" em termos de patogenicidade. Visto que ela é patogênica de damasco (Ll et al., 2010) e no presente estudo não foram realizados experimentos de infecção em modelo vegetal, como mudas de alfafa (BERNIER *et al.*, 2003), para determinar a fitopatogenicidade de TC3.4.2R3. Além disso, a patogenicidade de TC3.4.2R3 a G. mellonella é significativamente maior a 37°C que a 28°C, mostrando que na temperatura que reflete a infecção em hospedeiro mamífero, a linhagem se mostra mais virulenta. Entretanto, inoculação peritoneal em BALBc de 10⁷ UFC/mL não causou morte dos animais ao longo de 30 dias de experimento, sugerindo que esta linhagem não é patogênica a mamíferos (GONÇALVES et al., 2019).

3.5 Conclusões

Nesta etapa do estudo, foi realizada a obtenção de mutantes dos genes Bsem_02857 e Bsem_02858 do cluster n-TASE que codificam uma glicosiltransferase e metiltransferase. Foi realizada uma série de experimentos a fim de se caracterizar esses genes fenotipicamente.

A análise de antagonismo fúngico contra fitopatógenos, especialmente do gênero *Fusarium*, mostrou que a mutação realizada nos genes Bsem_02857 e Bsem_02858 em TC3.4.2R3 não resultou na perda de atividade antagônica. A comparação da atividade antagônica em duas temperatuas (28°C e 37°C) não permitiu observar a existência de um padrão, ou uniformidade entre os resultados, assim a expressão dos genes também não é termodependente para o fator antagonismo. Não sendo o antagonismo fúngico contra *Fusarium* spp. um fenótipo ideal para a diferenciação de TC3.4.2R3 de mutantes do cluster n-TASE.

A motilidade do tipo swimming não é afetada pela mutação desses genes, e a expressão desses genes também não é termodependente para o swimming. Na motilidade do tipo swarming observa-se uma redução gradativa na ordem: TC3.4.2R3, SST57 e SST58 apenas a 37°C. Dessa, forma o cluster n-TASE está envolvido na motilidade swarming, de forma termodependente.

O cluster n-TASE afeta a produção de biofilme, os mutantes dos genes Bsem_02857 e Bsem_02858 apresentam menor produção, porém não termodependente. Foi observado que há menor tolerância ao estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio no mutante SST58, seguido de SST57. Permitindo concluir que o n-TASE cluster influencia na tolerância ao estresse oxidativo.

A infecção de TC3.4.2R3 em modelo *G. mellonella* não sofre alterações com a expressão dos genes do cluster n-TASE, a taxa de mortalidade de lagartas não é alterada entre linhagens selvagem e mutantes. No entanto, após 48 horas de infecção, observou-se redução na sobrevivência do mutante SST58 na hemolinfa de *G. mellonella*, sendo possível que genes do cluster n-TASE estejam envolvido com a sobrevivência de TC3.4.2R3 em *G. mellonella*, não se refletindo na virulência da mesma para esse modelo. Além disso, a utilização de PCR para detecção de TC3.4.2R3 em *G. mellonella* se mostrou uma opção possível, utilizando primers específicos para a linhagem.

Até o presente, não foi possível caracterizar fenotipicamente o papel do cluster n-TASE em TC3.4.2R3. Com os experimentos realizados no presente estudo, pôde-se observar que existe uma correlação de natureza ainda desconhecida dos genes do n-TASE cluster com motilidade do tipo swarming, produção de biofilme, tolerância ao estresse oxidativo e sobrevivência bacteriana em hemolinfa de *G. mellonella*, mas não correlacionada à virulência bacteriana a este tipo de modelo de infecção.

REFERÊNCIAS

AARON, S. D. *et al.* Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with Burkholderia cepacia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 4, p. 1206-1212, 2000.

ARAÚJO, F. D. S.; ARAÚJO, W. L.; EBERLIN, M. N. Potential of *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 as Biocontrol Agent Against *Fusarium oxysporum* Evaluated by Mass Spectrometry Imaging. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, 2017.

ARAÚJO, W. L. *et al.* Genome sequencing and transposon mutagenesis of Burkholderia seminalis TC3. 4.2 R3 identify genes contributing to suppression of orchid necrosis caused by B. gladioli. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29, n. 6, p. 435-446, 2016.

AUBERT, D. F.; HAMAD, M. A.; VALVANO, M. A. A markerless deletion method for genetic manipulation of Burkholderia cenocepacia and other multidrug-resistant gram-negative bacteria. In: **Host-Bacteria Interactions**. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 311-327.

BAE, T.; SCHNEEWIND, O. Allelic replacement in Staphylococcus aureus with inducible counter-selection. **Plasmid**, v. 55, n. 1, p. 58-63, 2006.

BARRETT, A. R. *et al.* Genetic tools for allelic replacement in Burkholderia species. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 14, p. 4498-4508, 2008.

BAUER, A. W. Antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BERNIER, S.P. *et al.* Comparative analysis of plant and animal models for characterization of *Burkholderia cepacia* virulence. **Infection and immunity**, v. 71, n. 9, p. 5306-5313, 2003.

BODDEY, J. A. *et al.* Temperature-regulated microcolony formation by Burkholderia pseudomallei requires pilA and enhances association with cultured human cells. **Infection and immunity**, v. 74, n. 9, p. 5374-5381, 2006.

BROWN, N. F. *et al.* Identification of a novel two-partner secretion system from Burkholderia pseudomallei. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 272, n. 2, p. 204-215, 2004.

BURROWS, L. L. Pseudomonas aeruginosa twitching motility: type IV pili in action. **Annual review of microbiology**, v. 66, p. 493-520, 2012.

CARDONA, S. T.; MUELLER, C. L.; VALVANO, M. A. Identification of essential operons with a rhamnose-inducible promoter in Burkholderia cenocepacia. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2547-2555, 2006.

CHAN, Y. Y.; CHUA, K. L. The Burkholderia pseudomallei BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 14, p. 4707-4719, 2005.

CHANG, A. Y. *et al.* Preparation of calcium competent Escherichia coli and heatshock transformation. **JEMI methods**, v. 1, p. 22-25, 2017.

CHEN, R. *et al.* Dissection of quorum-sensing genes in Burkholderia glumae reveals non-canonical regulation and the new regulatory gene tofM for toxoflavin production. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e52150, 2012.

CHOI, K. H. *et al.* Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of Burkholderia pseudomallei. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 4, p. 1064-1075, 2008.

CHOI, K. H.; KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent Pseudomonas aeruginosa cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. **Journal of microbiological methods**, v. 64, n. 3, p. 391-397, 2006.

CHOI, K. H.; SCHWEIZER, H. P. An improved method for rapid generation of unmarked Pseudomonas aeruginosa deletion mutants. **BMC microbiology**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2005.

CHRISTEN, B. *et al.* The essential genome of a bacterium. **Molecular systems biology**, v. 7, n. 1, p. 528, 2011.

CHUANCHUEN, R.; NARASAKI, C. T.; SCHWEIZER, H. P. Benchtop and microcentrifuge preparation of Pseudomonas aeruginosa competent cells. **Biotechniques**, v. 33, n. 4, p. 760-763, 2002.

CLARK, D. J.; MAALØE, O. D. N. A. DNA replication and the division cycle in Escherichia coli. **Journal of molecular biology**, v. 23, n. 1, p. 99-112, 1967.

COHEN, S. N.; CHANG, A. C. Y.; HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. **Proceedings** of the National Academy of Sciences, v. 69, n. 8, p. 2110-2114, 1972.

COMPANT, S. *et al.* Diversity and occurrence of Burkholderia spp. in the natural environment. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 4, p. 607-626, 2008.

COSTA, S.; DÉZIEL, E.; L. F. Characterization of rhamnolipid production by Burkholderia glumae. **Letters in applied microbiology**, v. 53, n. 6, p. 620-627, 2011.

CRAIG, F. F. *et al.* A plasmid which can be transferred between Escherichia coli and Pasteurella haemolytica by electroporation and conjugation. **Microbiology**, v. 135, n. 11, p. 2885-2890, 1989.

DANIELS, R.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 3, p. 261-289, 2004.

DARLING, P. *et al.* Siderophore production by cystic fibrosis isolates of Burkholderia cepacia. **Infection and immunity**, v. 66, n. 2, p. 874-877, 1998.

DOWER, W.J.; MILLER, J.F.; RAGSDALE, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by voltage electroporation. **Nucleic Acids Research**, 16, 6127-6145.

DUBEAU, D. *et al.* Burkholderia thailandensis harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2009.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

EBERL, L. *et al.* Involvement of N-acyl-I-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of Serratia liquefaciens. **Molecular microbiology**, v. 20, n. 1, p. 127-136, 1996.

ERNST, R. K. *et al.* Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway Pseudomonas aeruginosa. **Science**, v. 286, n. 5444, p. 1561-1565, 1999.

ESSEX-LOPRESTI, A. E. *et al.* A type IV pilin, PilA, contributes to adherence of Burkholderia pseudomallei and virulence in vivo. **Infection and immunity**, v. 73, n. 2, p. 1260-1264, 2005.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING *et al.* European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, 2021. <u>http://www.eucast.org</u>.

FIGURSKI, D. H.; HELINSKI, D. R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 4, p. 1648-1652, 1979.

FLANNAGAN, R. S. *et al.* Burkholderia cenocepacia requires a periplasmic HtrA protease for growth under thermal and osmotic stress and for survival in vivo. **Infection and immunity**, v. 75, n. 4, p. 1679-1689, 2007.

FLANNAGAN, R. S.; LINN, T.; VALVANO, M. A. A system for the construction of targeted unmarked gene deletions in the genus Burkholderia. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1652-1660, 2008.

FLANNAGAN, R. S.; VALVANO, M. A. Burkholderia cenocepacia requires RpoE for growth under stress conditions and delay of phagolysosomal fusion in macrophages. **Microbiology**, v. 154, n. 2, p. 643-653, 2008.

FREY, J.; KRISCH, H. M. Ω mutagenesis in gram-negative bacteria: a selectable interposon which is strongly polar in a wide range of bacterial species. **Gene**, v. 36, n. 1-2, p. 143-150, 1985.

GEISENBERGER, O. *et al.* Production of N-acyl-L-homoserine lactones by P. aeruginosa isolates from chronic lung infections associated with cystic fibrosis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 184, n. 2, p. 273-278, 2000.

GIBSON, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature methods**, v. 6, n. 5, p. 343-345, 2009.

GONÇALVES, P. J. R. O. *et al.* Environmental interactions are regulated by temperature in Burkholderia seminalis TC3. 4.2 R3. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2019.

GONÇALVES, P. J. R. O. **Caracterização e avaliação do papel do gene wcbE de Burkholderia seminalis linhagem TC3.4.2R3 na interação microbiana**. 2017. 283f. Tese de Doutorado (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, USP, 2017.

GUNN, J. S. *et al.* PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. **Molecular microbiology**, v. 27, n. 6, p. 1171-1182, 1998.

GUO, L. *et al.* Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. **Cell**, v. 95, n. 2, p. 189-198, 1998.

HALL, C. M. *et al.* Diverse Burkholderia species isolated from soils in the southern United States with no evidence of B. pseudomallei. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0143254, 2015.

HAMAD, M. A. *et al.* Aminoarabinose is essential for lipopolysaccharide export and intrinsic antimicrobial peptide resistance in Burkholderia cenocepacia. **Molecular microbiology**, v. 85, n. 5, p. 962-974, 2012.

HARDING, C. R. *et al.* Use of Galleria mellonella as a model organism to study Legionella pneumophila infection. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 81, 2013.

HARRIS, L. J. *et al.* Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against Listeria monocytogene s. **Journal of food protection**, v. 52, n. 6, p. 384-387, 1989.

HARRISON, J. J. *et al*. Biofilms: a new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology. **American Scientist**, v. 93, n. 6, p. 508-515, 2005.

HORTON, R. M. *et al.* Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. **Biotechniques**, v. 54, n. 3, p. 129-133, 2013.

HUBER, B. *et al.* The cep quorum-sensing system of Burkholderia cepacia H111 controls biofilm formation and swarming motility. **Microbiology**, v. 147, n. 9, p. 2517-2528, 2001.

IBRAHIM, M. *et al.* Diversity of potential pathogenicity and biofilm formation among Burkholderia cepacia complex water, clinical, and agricultural isolates in China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2113-2123, 2012.

JANG, M. S. *et al.* Quorum sensing controls flagellar morphogenesis in Burkholderia glumae. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84831, 2014.

JIANG, W. Y. *et al.* RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 233-239, 2013.

JIANG, Y. *et al.* Multigene editing in the Escherichia coli genome via the CRISPR-Cas9 system. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 7, p. 2506-2514, 2015.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634-644, 2010.

KIM, J. *et al.* Regulation of polar flagellum genes is mediated by quorum sensing and FlhDC in Burkholderia glumae. **Molecular microbiology**, v. 64, n. 1, p. 165-179, 2007.

LAI, Y.P.; GALLO, R. L. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. **Trends in immunology**, v. 30, n. 3, p. 131-141, 2009.

LEE, C. *et al*. Stress tolerance and virulence-related roles of lipopolysaccharide in Burkholderia glumae. **The plant pathology journal**, v. 35, n. 5, p. 445, 2019.

LEHNINGER, A. L. Biochemistry. Worth Publ. Inc., New York, 1975.

LI, B. *et al.* Molecular characterization of Burkholderia cepacia complex isolates causing bacterial fruit rot of apricot. **Plant Pathol. J**, v. 26, p. 223-230, 2010.

LÓPEZ, C. M. *et al.* Versatile dual-technology system for markerless allele replacement in Burkholderia pseudomallei. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6496-6503, 2009.

LOU, M. M. *et al.* Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen Burkholderia seminalis. **Carbohydrate research**, v. 346, n. 11, p. 1294-1301, 2011.

LOUTET, S. A.; VALVANO, M. A. Extreme antimicrobial peptide and polymyxin B resistance in the genus Burkholderia. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 1, p. 6, 2011.

LUVIZOTTO, D. M. *et al.* Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1829-1836, 3 mar. 2010.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G. Burkholderia cepacia complex bacteria: opportunistic pathogens with important natural biology. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1539-1551, 2008.

MAHENTHIRALINGAM, E.; SIMPSON, D. A.; SPEERT, David P. Identification and characterization of a novel DNA marker associated with epidemic Burkholderia cepacia strains recovered from patients with cystic fibrosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 4, p. 808-816, 1997.

MANO, E. T. **Identificação de genes de** *Burkholderia* **sp. associados ao controle biológico de** *Pectobacterium carotovora***. 2011. 105f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, USP, 2011.**

MANO, E. T. **Prospecção de genes de Burkholderia seminalis TC3. 4.2 R3 com potencial para biocontrole**. 2016. 122f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, USP, 2016.

MAROLDA, C. L. *et al.* Micromethods for the characterization of lipid A-core and Oantigen lipopolysaccharide. In: **Glycobiology Protocols**. Humana Press, 2006. p. 237-252.

MCCLEAN, K. H. *et al.* Quorum sensing and Chromobacterium violaceum: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. **Microbiology**, v. 143, n. 12, p. 3703-3711, 1997.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. Journal of medical microbiology, v. 56, n. 12, p. 1581-1588, 2007.

NAGUIB, M. M.; VALVANO, M. A. Vitamin E increases antimicrobial sensitivity by inhibiting bacterial lipocalin antibiotic binding. **Msphere**, v. 3, n. 6, 2018.

NEVES, A. A. C. Identificação de genes de Burkholderia sp. associados a antagonismo a microrganismos fitopatogênicos. 2011. 62f Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, 2011.

NICKZAD, A.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Quorum sensing controls swarming motility of Burkholderia glumae through regulation of rhamnolipids. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128509, 2015.

NUMMILA, K. *et al.* Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of Escherichia coii are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A. **Molecular microbiology**, v. 16, n. 2, p. 271-278, 1995.

NZULA, S.; VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W. Influence of taxonomic status on the in vitro antimicrobial susceptibility of the Burkholderia cepacia complex. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 265-269, 2002.

ORTEGA, X. P. *et al.* A putative gene cluster for aminoarabinose biosynthesis is essential for Burkholderia cenocepacia viability. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 9, p. 3639-3644, 2007.

O'TOOLE, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. JoVE. 47. http://www.jove.com/details.php?id=2437, doi: 10.3791/2437

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.

PANHWAR, Q. A. *et al.* Aluminum toxicity-induced alterations in the leaf proteome of rice contrasting response towards inoculation of plant growth-promoting bacteria. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 10, p. 1-11, 2017.

PEREIRA, T. C. Introdução à técnica de CRISPR. **Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética**, 2016.

PETERS, J. M. *et al.* A comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria. **Cell**, v. 165, n. 6, p. 1493-1506, 2016.

PHILLIPS, P. I. *et al.* A guide to sensitivity testing. **Journal of antimicrobial chemotherapy (Print)**, v. 27, p. i-vi, 1991.

PRENTKI, P.; KRISCH, H. M. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. **Gene**, v. 29, n. 3, p. 303-313, 1984.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, Chris. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual review** of biochemistry, v. 71, n. 1, p. 635-700, 2002.

RAHMAN, M. D. *et al.* Antibacterial activities of Actinomycete isolates collected from soils of Rajshahi, Bangladesh. **Biotechnology research international**, v. 2011, 2011.

RAMLI, N. S. K. *et al.* The effect of environmental conditions on biofilm formation of Burkholderia pseudomallei clinical isolates. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e44104, 2012.

REYRAT, J. M. *et al.* Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 66, n. 9, p. 4011-4017, 1998.

ROHDE, J. R.; FOX, J. M.; MINNICH, S. A. Thermoregulation in Yersinia enterocolitica is coincident with changes in DNA supercoiling. **Molecular microbiology**, v. 12, n. 2, p. 187-199, 1994.

ROUWS, L. F. M. Mutagênese de transposon como ferramenta em estudos fisiológicos e ecológicos da bactéria Gluconacetobacter diazotrophicus. 2008.

161f. Tese (Doutorado em Química Biológica) - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, UFRJ, 2008.

SAENZ, H. L.; DEHIO, C. Signature-tagged mutagenesis: technical advances in a negative selection method for virulence gene identification. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 5, p. 612-619, 2005.

SAITOH, H.; TERAUCHI, R. Burkholderia glumae competent cells preparation and transformation. **Bio-protocol**, v. 3, n. 23, p. e985-e985, 2013.

SAJJAN, U. S. *et al.* Cable (cbl) type II pili of cystic fibrosis-associated Burkholderia (Pseudomonas) cepacia: nucleotide sequence of the cblA major subunit pilin gene and novel morphology of the assembled appendage fibers. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 4, p. 1030-1038, 1995.

SAMBROOK, H. C. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY. 1989.

SEED, K. D.; DENNIS, J. J. Development of Galleria mellonella as an alternative infection model for the Burkholderia cepacia complex. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 1267-1275, 2008.

SPEERT, D. P. *et al.* Epidemiology of Burkholderia cepacia complex in patients with cystic fibrosis, Canada. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 2, p. 181, 2002.

SPENCE, C. *et al.* Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections. **BMC plant biology**, v. 14, n. 1, p. 1-17, 2014.

SUNG, C. K. *et al.* An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in Streptococcus pneumoniae. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5190-5196, 2001

TALLAPRAGADA, P.; DIKSHIT, R.; SESHAGIRI, S. Isolation and optimization of IAA producing Burkholderia seminalis and its effect on seedlings of tomato. **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, v. 37, n. 5, 2015.

TAMAYO, R. *et al.* Identification of cptA, a PmrA-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the Salmonella enterica serovar typhimurium lipopolysaccharide core. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 10, p. 3391-3399, 2005.

TAWEECHAISUPAPONG, S. *et al.* Virulence of Burkholderia pseudomallei does not correlate with biofilm formation. **Microbial pathogenesis**, v. 39, n. 3, p. 77-85, 2005.

THWAITE, J. E. *et al.* The cationic peptide magainin II is antimicrobial for Burkholderia cepacia-complex strains. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. 7, p. 923-929, 2009.

TORRES, M. *et al.* N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from hatchery bivalve larval cultures. **Microbiological research**, v. 168, n. 9, p. 547-554, 2013.

TREMBLAY, J. *et al.* Self-produced extracellular stimuli modulate the Pseudomonas aeruginosa swarming motility behaviour. **Environmental microbiology**, v. 9, n. 10, p. 2622-2630, 2007.

TSUI, S. **Estudo do cluster n-TASE nas interações ambientais de** *B.* **seminalis TC3.4.2R3**. 2021. 283f. Tese de Doutorado (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São

ULRICH, R. L. *et al.* Aerogenic vaccination with a Burkholderia mallei auxotroph protects against aerosol-initiated glanders in mice. **Vaccine**, v. 23, n. 16, p. 1986-1992, 2005.

VANDAMME, P.; DAWYNDT, P. Classification and identification of the Burkholderia cepacia complex: past, present and future. **Systematic and applied microbiology**, v. 34, n. 2, p. 87-95, 2011.

VANLAERE, E. *et al.* Burkholderia latens sp. nov., Burkholderia diffusa sp. nov., Burkholderia arboris sp. nov., Burkholderia seminalis sp. nov. and Burkholderia metallica sp. nov., novel species within the Burkholderia cepacia complex. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 1580-1590, 2008.

VENTURI, V. *et al.* Quorum sensing in the Burkholderia cepacia complex. **Research in microbiology**, v. 155, n. 4, p. 238-244, 2004.

WAH-TANG, P. *et al.* A review of gene knockout strategies for microbial cells. **Recent patents on biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 176-197, 2015.

WINFIELD, M. D.; LATIFI, T.; GROISMAN, E. A. Transcriptional regulation of the 4amino-4-deoxy-L-arabinose biosynthetic genes in Yersinia pestis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 15, p. 14765-14772, 2005.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Unifying themes in host defence effector polypeptides. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 727-740, 2007.

ZHANG, M. *et al.* Identification of Genes Involved in Antifungal Activity of Burkholderia seminalis Against Rhizoctonia solani Using Tn5 Transposon Mutation Method. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 797, 2020.

ZLOSNIK, J. E. A. *et al.* Swimming motility in a longitudinal collection of clinical isolates of Burkholderia cepacia complex bacteria from people with cystic fibrosis. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e106428, 2014.

4 CONCLUSÕES

Considerando que o objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a origem evolutiva do cluster n-TASE, os resultados obtidos permitiram concluir que:

(i) A região que compreende às *locus tags* Bsem_02857 a Bsem_02860 (cluster n-TASE) da linhagem TC3.4.2R3 de *B. seminalis* está ausente nos genomas de *Burkholderia seminalis* disponíveis e em linhagens de *B. cenocepacia* J2315 e *B. ambifaria* AMMD, entre outras espécies de *Burkholderia*;

(ii) o cluster n-TASE foi adquirido por transferência horizontal, sendo muito similar à região homóloga nas linhagens *Aquamicrobium* sp. SK-2 e *B. contaminans* LMG23361, com as quais deve compartilhar um ancestral comum;

(iii) existe uma correlação, de natureza biológica ainda desconhecida dos genes do cluster n-TASE com a motilidade do tipo swarming, produção de biofilme, tolerância ao estresse oxidativo e sobrevivência na hemolinfa de *G. mellonella*;

E, finalmente, utilizando as diversas metodologias de nocaute gênico já utilizadas em espécies do grupo Bcc pode-se concluir que:

(**iv**) apenas a mutagênese insercional com o plasmídeo pGPΩTp permitiu a obtenção de mutantes para *B. seminalis* TC3.4.2R3, sugerindo que devem existir aspectos do processo de recombinação e reparo do DNA nesta linhagem que impossibilitam a utilização das metodologias rotineiramente utilizadas para este grupo de bactérias.